

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
Direktor Prof. Dr. med B. Gänsbacher

Angefertigt unter der Leitung von
PD Dr. Ilka Ott

Vorgelegt über
Univ. Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl
Des Instituts für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Vorstand Univ. Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl)

**Lokale Applikation von Erythropoietin und endothelialen Progenitorzellen zur
Regeneration des experimentellen Myokardinfarktes der Nacktratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Sandra Tanja Natalie Kühnel

aus
Frankfurt / Main

München, 2007

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Gabius

Tag der Promotion: 18.Juli 2008

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung.....	3
2. Schrifttum	4
2.1 Endotheliale Vorläuferzellen	4
2.1.1 Herkunft.....	4
2.1.2 Isolation und Identifikation von endothelialen Progenitorzellen	5
2.1.3 Homing und Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen	8
2.1.4 Therapeutischer Einsatz von endothelialen Progenitorzellen	10
2.1.5 Transplantation von endothelialen Progenitorzellen nach Myokardinfarkt	11
2.2 Erythropoietin.....	13
2.2.1 Molekularstruktur des EPO Proteins.....	13
2.2.2 Organe der Produktion und Expression von Erythropoietin und dessen Rezeptor.....	15
2.2.3 Der Erythropoietinrezeptor und Erythropoietininduzierte Gentranskription	18
2.2.3 Hypoxieinduzierte EPO Synthese.....	21
2.2.4 Eigenschaften von EPO	23
2.3 Reperfusionssyndrom	31
2.3.1 Apoptose und Nekrose	31
2.3.2 Intrazelluläre Veränderungen nach Ischämie, Reperfusion	33
2.4 Myokardinfarktmodelle	37
2.4.2 Tiermodelle des akuten Myokardinfarktes	37
2.4.3 Rattenmodell im Vergleich zum Mausmodell.....	38
3. Eigene Untersuchungen	40
3.1 Zielvorstellung	40
3.2 Material und Methoden	40
3.2.1 Zellbearbeitung.....	40
3.2.2 Zellgewinnung	41
3.2.3 Zusatz von EPO	42
3.2.4 Versuchstiere und Versuchstierhaltung	43
3.2.5 Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung	44
3.2.6 Versuchsdurchführung	45
3.2.7 Probenaufbereitung	56

INHALTSVERZEICHNIS

3.3 Ergebnisse des Versuches der Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von EPCs im akuten Myokardinfarkt	64
3.3.1 Ergebnisse in vivo	64
3.4 Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Myokardinfarktmodelle: Modell der transienten Ligatur mit anschließender Reperfusion und des Modells der permanenten Ligatur der LAD	81
3.4.1 Ergebnisse in vivo	81
3.4.2 Ergebnisse ex vivo	90
4. Diskussion	94
4.1 Einleitung	94
4.2 Versuchsmodelle	95
4.3 Wirkungen einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt	98
4.3.1 Ergebnisse in vivo	99
4.3.2 Ergebnisse ex vivo	104
4.4 Vergleich der Modelle der transienten Ligatur mit Reperfusion und der permanenten Ligatur der A. paracoronaria sinistra	110
4.4.1 Ergebnisse in vivo	110
4.4.2 Ergebnisse ex vivo	113
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	116
5. Zusammenfassung	118
6. Summary	120
7. Literaturverzeichnis	122
8. Tabellenverzeichnis	135
9. Abbildungsverzeichnis	136
10. Diagrammverzeichnis	137
11. Abkürzungsverzeichnis	138
12. Danksagung	141

1. Einleitung

Die ischämische Herzerkrankung nach Myokardinfarkt verursacht über 50% der durch kardiovaskuläre Erkrankungen bedingten Todesfälle und ist die Hauptursache für kongestives Herzversagen (Urbanek et al. 2005). Die geschätzte jährliche Anzahl an kardiovaskulären Erkrankungen in den USA liegt bei 80.700.000, wobei jeder dritte Patient an mehreren Erkrankungstypen parallel erkrankt. Der Anteil an Myokardinfarkten bei diesen Erkrankungen liegt bei 8.100.000 (Rosamond 2007).

Trotz immer weiteren Fortschritten in der Therapie des akuten Myokardinfarktes bleibt die Häufigkeit ischämischer Herzerkrankungen und die damit zusammenhängende kardiale Dysfunktion mit ihren klinischen Folgen hoch (Pfeffer and Braunwald 1990).

Um die Myokardschädigung so gering wie möglich zu halten, muss die Regeneration des geschädigten Gewebes wieder angeregt werden. Die Regeneration vieler adulter Organe geschieht mit Hilfe von somatischen Progenitorzellen. Die Isolation und die Untersuchung dieser Zellen hat ergeben, dass sie zu postnataler Organogenese führen können. Aus diesem Grund könnten somatische Progenitorzellen für die Therapie geschädigter Organe eingesetzt werden. (Masuda and Asahara 2003). Nachdem es Asahara et al 1997 gelang, endotheliale Progenitorzellen (EPCs) zu isolieren, wurde festgestellt, dass diese gemeinsame Vorläuferzellen mit hämatopoietischen Stammzellen besitzen. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass EPCs aus dem Knochenmark stammen und bei physiologischer und pathologischer postnataler Neovaskularisation eine Rolle spielen. So ist es möglich, EPCs in ischämische Areale des Myokards zu transplantieren, wo diese zu Neovaskularisation beitragen, was eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und eine verminderte myokardiale Fibrose zur Folge hat (Eguchi et al. 2007).

Neben der positiven Wirkung von EPCs auf einen ischämischen Myokardschaden wurde untersucht, ob auch Erythropoietin eine protektive Funktion bei verschiedenen Herzerkrankungen aufweist, indem es mit Hilfe weiterer Faktoren die Stammzellregeneration im infarzierten Myokard positiv beeinflusst und die myokardiale Funktion deutlich verbessert. So wird durch verschiedene Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren die Mobilisation, Inkorporation, das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung von Stammzellen gesteigert, was wiederum zur myokardialen Regeneration beiträgt. Zu diesen Faktoren gehören neben

EINLEITUNG

Interleukinen und Wachstumsfaktoren mit chemotaktischen Eigenschaften wie u.a. IL-6 und VEGF auch Signalfaktoren wie EPO, die die Kardiogenese und Neoangiogenese beeinflussen (Vandervelde et al. 2005). Weiterhin wurde postuliert, dass die in vitro Inkubation von endothelialen Progenitorzellen mit EPO deren Proliferationsrate verbessert, die Apoptoserate vermindert und die Anzahl von murenen Endothelzellen erhöht (Müller-Ehmsen et al, 2005).

In bisherigen Untersuchungen bezüglich der therapeutischen Möglichkeiten eines akuten Myokardinfarktes wurde EPO gemeinsam mit endothelialen Progenitorzellen bis jetzt nur intravenös (i.v.), intraperitonäal oder subkutan (Heeschen et al. 2003; Hirata et al. 2006) verabreicht.

Krause et al injizierten EPO beim Schwein auch intramyokardial, jedoch ohne den Zusatz von EPCs (Krause et al. 2006).

Die eben genannten Studien zeigen sowohl, dass die gemeinsame systemische Injektion von EPO und EPCs in vitro zu verlängerten Überlebensraten führen (Heeschen et al. 2003), als auch, dass die intramyokardiale Injektion von endothelialen Progenitorzellen positive Effekte auf die linksventrikuläre Funktion nach experimentellem Myokardinfarkt bewirkt (Ott et al. 2005).

Aus diesen Untersuchungen ergab sich unsere Hypothese, dass durch die simultane intramyokardiale Injektion von EPCs und EPO die positiven Effekte der EPCs bei der myokardialen Regeneration nach experimenteller Ischämie verstärkt werden könnten.

2. Schrifttum

2.1 Endotheliale Vorläuferzellen

2.1.1 Herkunft

Noch vor einigen Jahren war man davon überzeugt, dass die postnatale Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) ausschließlich aus Proliferation und Migration von präexistenten Endothelzellen hervorgeht (Risau et al. 1988). Diese Fähigkeit, auch im adulten Individuum eine Gefäßneubildung vollziehen zu können, ist essentiell für die Regeneration von wachsendem, verletztem oder ischämischem Gewebe (Risau 1997).

Im Gegensatz hierzu wurde die embryonale primäre Blutgefäßbildung als „Vaskulogenese“ bezeichnet, ausgehend von aus dem Knochenmark (KM) stammenden endothelialen Vorläuferzellen (endotheliale Progenitorzellen; EPCs) und Angioblasten (Risau et al. 1988). Die Vaskulogenese beginnt mit der Bildung von Zellhaufen und Blutinseln im embryonalen Dottersack (Risau 1995). In der Peripherie dieser Blutinseln findet man Angioblasten, im Zentrum hämatopoetische Stammzellen (HSCs). Aus den Angioblasten entwickeln sich später reife Endothelzellen, aus den HSCs werden reife Blutzellen. Durch Wachstum und Fusion einzelner Blutinseln entsteht das fetale Kapillarnetzwerk (Risau and Flamme 1995). Nach dem Einsetzen der Blutzirkulation differenziert sich dieses Kapillarnetzwerk in ein arteriovenöses System.

Auf Grund dieser Tatsache und der Feststellung, dass beide Zellarten gemeinsame Oberflächenantigene, unter anderem flk-1, Tie-2, c-kit, Sca-1, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), CD133 und CD34 besitzen, kam man zu dem Ergebnis, dass beide von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, dem Hämangioblasten, abstammen (Flamme and Risau 1992).

Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass auch aus adultem Knochenmark mobilisierte endothelialen Progenitorzellen zu postnataler Vaskulogenese führen können. Diese adulten endothelialen Progenitorzellen ähneln embryonalen Angioblasten, haben aber zusätzlich die Fähigkeit erlangt zu zirkulieren, zu proliferieren und sich in reife Endothelzellen zu differenzieren (Rafii 2000).

2.1.2 Isolation und Identifikation von endothelialen Progenitorzellen

Neben der Gewinnung aus dem Knochenmark können endotheliale Progenitorzellen auch aus fetaler Leber, Nabelschnurblut, Fettgewebe, und peripherem Blut isoliert werden. Zur Isolierung verwendet man in der Regel magnetische Kugeln, welche mit bestimmten Antikörpern wie anti-CD133, anti-CD34, anti-CD14 oder anti-CD146 beschichtet sind (vgl. 3.2.2).

Die Hauptquellen, aus denen endotheliale Vorläuferzellen zu therapeutischen Zwecken isoliert werden können, sind adultes peripheres Blut, Nabelschnurblut und Knochenmark („late outgrowth“) oder mononukleäre Zellen in Kultur („early outgrowth“). Die Zellzahl in den jeweiligen Geweben variiert stark, die Anzahl der

SCHRIFTTUM

endothelialen Progenitorzellen an der Gesamtzahl der sich im Knochenmark befindenden Zellen beträgt ca. 1%, die im peripheren adulten Blut zwischen 0,001% und 0,01% (Smadja et al. 2007). Das Verhältnis der endothelialen Progenitorzellen in peripherem Blut: Nabelschnurblut : Knochenmark beträgt 1:10:15 (Murohara 2001).

Die Isolierung von endothelialen Vorläuferzellen aus peripherem adulten Blut ist prinzipiell möglich (Gawehn 2005). Ein Vorteil besteht darin, dass Eigenblut als Autotransplantat genutzt werden kann und somit eine Immunreaktion umgangen wird (Kalka et al. 2000). Allerdings befindet sich im peripheren Blut, im Vergleich zu den anderen möglichen Quellen, die geringste Anzahl an endothelialen Progenitorzellen. Überträgt man die im Tierversuch erarbeiteten Ergebnisse auf den Menschen, so wären pro Gramm Körpergewicht (KG) des Menschen $0,5-2,0 \times 10^4$ humane endotheliale Progenitorzellen notwendig, um eine ischämischen Gliedmaße zu therapieren. Dies entspräche einer Blutmenge von ca. 12l (Eguchi et al. 2007). Da diese Menge an Blut einem einzelnen Menschen nicht entnommen werden kann, müssen Möglichkeiten zur Erhöhung der Gesamtzahl der endothelialen Progenitorzellen in Betracht gezogen werden. Dies kann durch eine Stimulation der EPC-Freisetzung aus dem Knochenmark vor der Blutabnahme oder die ex vivo Expansion der endothelialen Progenitorzellen bewirkt werden (Takahashi et al. 1999).

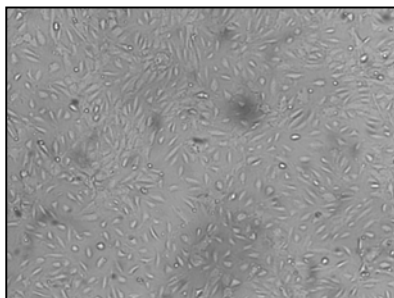
Neben dem peripheren Blut kann auch autologes Knochenmark als alternative Quelle für endotheliale Progenitorzellen verwendet werden, welches ebenfalls keine Immunreaktion hervorruft (Kamihata et al. 2001; Shintani et al. 2001). Knochenmark enthält eine große Menge von endothelialen Progenitorzellen, hämatopoietischen Stammzellen und weiteren Stammzellen (Asahara et al. 1999). Weiterhin wurde bereits nachgewiesen, dass auch die Transplantation von autologem Knochenmark die Angiogenese in ischämischen Geweben verbessert (Kamihata et al. 2001).

Als dritte, sehr effektive und am wenigsten invasive Quelle für die Isolation von endothelialen Progenitorzellen bietet sich Nabelschnurblut an. Im Nabelschnurblut befindet sich die zehnfache Menge an endothelialen Progenitorzellen im Vergleich zum peripheren Blut (Asahara et al. 1999), wobei die Gesamtanzahl der zu gewinnenden Zellen (ohne Zellexpansion ex vivo) auf Grund des geringeren Volumens des Nabelschnurblut annähernd die Gleiche wie die aus peripherem Blut zu erhaltende ist (Kalka et al. 2000; Ott et al. 2005).

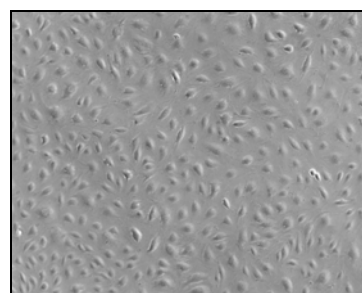
SCHRIFTTUM

Im Gegensatz zu aus peripherem Blut oder Knochenmark isolierten endothelialen Progenitorzellen zeigen die aus Nabelschnurblut stammenden endothelialen Progenitorzellen eine höhere Proliferationsrate, welche sich beim Expandieren in einer größeren Anzahl von Zellkolonien, einer gesteigerten Zellzyklusrate, einem höheren Selbsterneuerungspotential und längeren Telomeren mit gesteigerter Aktivität verdeutlicht (Mayani and Lansdorp 1994) (Vaziri et al. 1994).

Von Gulati und Hur wurden 2003 bzw. 2004 zwei verschiedene Typen von endothelialen Progenitorzellen beschrieben (Abb.1). Beide Subtypen können im Tiermodell zu Angiogenese führen und synergistisch wirken (Gulati et al. 2003; Yoon et al. 2005). Zum einen „Early EPCs“, die aus isolierten mononukleären Zellen in Kultur innerhalb von 4-7 Tagen erscheinen, eine spindelförmige Morphologie aufweisen und sowohl endotheliale (von Willebrand Faktor, vWF), als auch monozytäre (CD14) Oberflächenantigene besitzen. Zum anderen „late EPCs“, die erst nach 2-3 Wochen in Kultur erscheinen, eine pflastersteinartiges Erscheinungsbild haben, nur endotheliale Oberflächenantigene besitzen und eine hohe Proliferationsrate aufweisen (Gulati et al. 2003; Hur et al. 2004).



early EPCs



late EPCs

Abbildung 1 : Vergleichende Betrachtung des Phänotyps von „early“ und „late“ EPCs (mit freundlicher Genehmigung von I.Ott)

Zu diesem Zeitpunkt ist es nur schwer möglich, „unreife“ EPCs von primitiven HSCs zu unterscheiden, da diese beiden Zellen dieselben Oberflächenantigene, wie CD133, CD34 oder VEGFR2 besitzen. Reifende EPCs dagegen zeigen zwar CD31 und VEGFR2, aber weniger CD34 und CD133 und beginnen weitere Endothelzellmarker wie VE-cadherin oder E-selectin zu exprimieren (Peichev et al. 2000).

2.1.3 Homing und Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen

Es wurde gezeigt, dass zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende endotheliale Progenitorzellen an postnataler Vaskulogenese beteiligt sind. Neben der physiologischen Vaskulogenese spielen endotheliale Progenitorzellen eine Rolle bei der Regeneration von beschädigten Endothelien. Nach einem traumatischen Insult des Gefäßendothels, hochgradigen Verbrennungen oder nach anderen ischämischen Insulten (z.B. Myokardinfarkt.) werden endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark mobilisiert, reichern sich in den betroffenen Arealen an („homing“) und differenzieren sich zu reifen Endothelzellen. Die Mobilisierung und die Anreicherung in ischämischen Arealen werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Unter anderem scheint VEGF ein wichtiger Mediator für die EPC-Mobilisierung zu sein. VEGF wird vor allem in hochgradig ischämischen und tumorös veränderten Geweben exprimiert (Banai et al. 1994; Carmeliet and Jain 2000). Hierbei wird die gesteigerte VEGF-Transkription vor allem durch den in hypoxischen Geweben vermehrt gebildeten hypoxia-inducible-factor-1 (HIF-1) induziert (Shweiki et al. 1992). Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass sich auch nach externer Zufuhr von VEGF bereits innerhalb von 24 Stunden die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden EPCs ansteigt (Asahara et al. 1999).

Weiterhin wurde festgestellt, dass auch der granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) die durch endotheliale Progenitorzellen vermittelte Vaskulogenese in Tumoren fördert (Natori et al. 2002).

Selbst Östrogen besitzt eine stimulierende Wirkung auf die Freisetzung von endothelialen Progenitorzellen. Es wurde untersucht, dass die Reendothelisierung nach Arterienverletzungen bei ovaiektomierten Mäusen die mit 17 β -Estradiol behandelt wurden wesentlich schneller und effektiver eintrat, als bei der Kontrollgruppe, die kein 17 β -Estradiol erhielt (Strehlow et al. 2003).

In den letzten Jahren beschäftigten sich viele Studien mit der Wirkung von HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA)-Reduktase-Inhibitoren („Statinen“) auf die Vaskulogenese. Llevadot et al fanden heraus, dass extern zugeführtes Simvastatin die Menge der im peripheren Blut zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen erheblich

erhöht und die knochenmarkabhängige korneale Neovaskularisation der Maus fördert (Llevadot et al. 2001).

Neben den genannten Agentien spielen auch physiologische und pathologische Vorgänge eine Rolle bei der EPC-Freisetzung. So ist bekannt, dass physisches Training die endotheliale Funktion, die Bildung von Kollateralgefäßen und die Belastungsfähigkeit nach Myocardinfarkt steigert (Hornig et al. 1996; Hambrecht et al. 1998). Das Training erhöht die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen im peripheren Blut, im Knochenmark und in der Milz (Rehman et al. 2004). Diese Steigerung der absoluten Menge der endothelialen Progenitorzellen könnte mit angehobenen endothelialen NO- (Stickstoff) und VEGF-Levels, oder mit einer verminderten Apoptoserate zusammenhängen (Laufs et al. 2004).

Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren korrelieren negativ mit Anzahl und Eigenschaften der EPCs und der endothelialen Funktion. So sind Anzahl und Funktion bei Personen mit erhöhten Serumcholesterolwerten reduziert und Patienten mit Bluthochdruck zeigen eine verminderte Migrationsaktivität (Vasa et al. 2001; Hill et al. 2003).

Ein weiterer Faktor für eine verminderte EPC-Aktivität, reduzierte Proliferationsneigung und geringere Adhäsionseigenschaften sind Diabetes mellitus (Tepper et al. 2002; Loomans et al. 2004) und das Rauchen. Bei Rauchern zeigte sich zusätzlich eine reduzierte Anzahl an zirkulierenden und kultivierbaren Zellen. Jedoch ist dieser Vorrang reversibel, sobald die betroffenen Personen das Rauchen einstellen (Kondo et al. 2004).

Personen mit akutem Herzversagen oder stabiler Angina pectoris weisen dahingegen eine erhöhte Anzahl an endothelialen Progenitorzellen auf (Tepper et al. 2002; George et al. 2004).

Patienten mit akutem Myocardinfarkt zeigen innerhalb der ersten Woche nach Infarkt eine steigende Anzahl der endothelialen Progenitorzellen mit ihrem Höhepunkt am siebten Tag. Von diesem Zeitpunkt an ist die Anzahl der EPCs rückläufig und ist ab dem 60.Tag mit der Kontrollgruppe vergleichbar (Shintani et al. 2001). Dies hängt damit zusammen, dass ein akuter Myokardinfarkt immer mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Hierbei steigen die Plasmakonzentrationen von IL-8, was wiederum mit der gesteigerten Mobilisation von CD133+ Progenitorzellen assoziiert ist. Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist die Aktivierung von MMP-

9 und beta2-integrin LFA-1 durch IL-8, und eine dadurch bedingte Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark (Schömig K 2006)

2.1.4 Therapeutischer Einsatz von endothelialen Progenitorzellen

Momentan wird der therapeutische Einsatz von EPCs in drei verschiedenen Fällen in Betracht gezogen: bei peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten, nach einem Myocardinfarkt oder im Rahmen des Einsatzes von Gefäßimplantaten.

Als Modell für die ischämische Gliedmaßenkrankung wird durch die Ligatur der A. femoralis bei der Maus eine Ischämie im Bereichs der Hintergliedmaße provoziert. Nach lokaler Injektion von endothelialen Progenitorzellen wurde, im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die keine EPCs erhielten, eine erhöhte Bildung von Kollateralgefäßen, ein verbesserter Blutfluss, eine Reduktion der nekrotischen Areale und eine Verminderung der Autoamputationsrate festgestellt (Murohara et al. 2000; Schatteman et al. 2000). Nach Induktion eines Myokardinfarktes mittels Ligatur der LAD bewirkt die intramyocardiale Injektion von endothelialen Progenitorzellen am Modell der Nacktratte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine gesteigerte Neovaskularisation im Randgebiet des Infarktes, eine verminderte myocardiale Fibrose und eine Verbesserung der myokardialen Funktion (Taguchi et al. 2004; Ott et al. 2005). Weiterhin wurde der Einsatz von EPCs bei der Transplantation von Gefäßtransplantaten untersucht. Kaushal et al. isolierten und expandierten endothelialen Progenitorzellen aus peripherem Schafsblut ex vivo, die auf dezellularisierte Schweinegefäßtransplantate verbracht wurden. Hierbei wird eine höhere Biokompatibilität, eine verbesserte Oberflächenepithelisierung und eine gesteigerte Vaskularisation der mit endothelialen Progenitorzellen bestückten, im Gegensatz zu den EPC-freien Transplantaten beschrieben. (Kaushal et al. 2001).

Neben den klinischen Vorteilen sollten aber nicht die theoretisch möglichen Nebenwirkungen der Transplantation von endothelialen Progenitorzellen außer Betracht gelassen werden. Zusätzlich zu den immer noch bestehenden Problemen der Expansion der Zellen ex-vivo muss damit gerechnet werden, dass sich in vitro expandierte Zellen phenotypisch verändern und eine abnormale Differenzierung aufweisen können. So ist es denkbar, dass es zu einer veränderten Zellaktivierung oder Stimulation kommen kann (Asahara et al. 1997; Asahara et al. 1999).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass expandierte endothelialen Progenitorzellen an Aktivität verlieren oder sich bei symmetrischer Verabreichung in nicht dafür vorgesehenen Organen niederlassen und dadurch eine abnorm gesteigerte Vaskulogenese (z.B. in der Retina) verursachen oder vermehrtes Tumorwachstum induzieren (Asahara et al. 1999).

2.1.5 Transplantation von endothelialen Progenitorzellen nach Myokardinfarkt

Eines der gängigsten Modelle zur Untersuchung des Myokardinfarktes ist die Ligatur des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra (LAD) bei der Nacktrate mit anschließender Transplantation von endothelialen Progenitorzellen. Innerhalb dieses Modelles können EPCs entweder systemisch (Kawamoto et al. 2001), intrakoronar (Katrakis DG 2005) oder intramyokardial (Ott et al. 2005) injiziert werden.

Mittlerweile ist bekannt, dass endotheliale Progenitorzellen nach einem Gefäßtrauma spontan aus dem Knochenmark mobilisiert werden und im peripheren Blut zirkulieren (Gill et al. 2001; Shintani et al. 2001; Vasa et al. 2001). Dieses Phänomen wirft aber die Frage auf, warum die mobilisierten Zellen nicht immer alle geschädigten Gewebe wieder komplett regenerieren. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass sich auch unreife endothelialen Progenitorzellen unter den zirkulierenden Zellen befinden. Bei diesen greift die Signaltransduktionskaskade noch nicht und sie sind deshalb auch noch nicht in der Lage, sich in die jeweils ischämischen Areale zu integrieren. Ein weiterer Grund wäre die verminderte Perfusion und das dadurch entstehende geringere Blutangebot in den geschädigten Arealen, aus welchem eine geringeren Anzahl der endothelialen Progenitorzellen, welche in das ischämische Gebiet transportiert werden, resultiert (Rafii and Lyden 2003).

Auf Grund der oben genannten Argumente erscheint es sinnvoll, endothelialen Progenitorzellen nach Myokardinfarkt nicht systemisch, sondern lokal zu applizieren, da auf diesem Weg eine direkte Transplantation in ausreichender Konzentration in das geschädigte Gewebe erfolgen kann.

Kawamoto et al injizierten frisch isolierte CD34+ Zellen in das ischämische Randgebiet nach Myokardinfarkt bei der Nacktrate (Kawamoto et al. 2003). Hierbei wurde deutlich, dass sich endotheliale Progenitorzellen in das Myokard einfügen, zu

SCHRIFTTUM

maturen Endothelzellen differenzieren und eine Gefäßneubildung im ischämischen Randgebiet fördern. Weiterhin wurden echokardiographisch eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine verminderte Fibroserate festgestellt. Diese Ergebnisse waren allerdings vergleichbar mit denen anderer Arbeiten, in denen die EPCs i.v. verabreicht wurden (Kawamoto et al. 2001; Kocher et al. 2001).

Im Gegensatz zu der in vorherigen Versuchen (Kocher et al. 2001) i.v. injizierter Menge an endothelialen Progenitorzellen war bei der intramyokardialen Injektion ein um das 20-fache geringere Zellzahl notwendig, um einen vergleichbaren Effekt zu erhalten (Kawamoto et al. 2003).

	<u>INTRAVENÖSE</u> <u>INJEKTION</u>	<u>INTRAMYOKARDIALE</u> <u>INJEKTION</u>
Quelle	Kawamoto et al 2001	Kawamoto et al 2003
Modell	Ligatur der LAD	Ligatur der LAD
Zellen	Humane EPCs	Humane EPCs
Zellzahl	106 EPCs in 200µl EBM-2	105 EPCs in 100µl PBS
fibrosiertes Gewebe (in%)	9	11
LVDd (cm)	0,9	0,8
LVDs (cm)	0,7	0,6
FS (in %)	25	30
RWM score	24	21

Tabelle 1 : Vergleichende Betrachtung der intravenösen vs intramyokardialen Injektion von humanen EPCs am Rattenmodell nach Ligatur der LAD (Bewertung mittels Echokardiographie)

(LVDd = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels, LVDs = endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels, FS = Verkürzungsfraction, RWM = regionale Wandbewegung)

2.2 Erythropoietin

Es ist es schon ein Jahrhundert vergangen, seit Carnot und Deflandre postulierten, dass eine humorale Struktur, die sie „Hämopoietin“ nannten, die Erythrozytenproduktion regulieren würde (Carnot P 1906). Viele Jahre war man der Meinung, dass dieses „Hämopoietin“ lediglich eine Wirkung auf Erythrozyten besitze, indem es die Produktion, Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Erythrozyten im Knochenmark (KM) fördert und somit die Gesamtzahl der roten Blutzellen erhöht. 1948 wurde der Name „Hämopoietin“ in „Erythropoietin“ (EPO) geändert (Bonsdorff E 1948).

Von der Meinung, dass EPO lediglich erythroide Progenitorzellen beeinflusst, wich man erst ab, als festgestellt wurde, dass das EPO-Gen auch in Hoden und Milz exprimiert wird (Anagnostou et al. 1990).

Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass EPO neben der Stimulation der Erythropoiese noch weitere Wirkungen besitzt, von denen einige im Folgenden erläutert werden sollen.

2.2.1 Molekularstruktur des EPO Proteins

Das EPO Gen ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert. EPO ist ein Glycoprotein, das aus 165 Aminosäuren (AS) besteht. Die EPO-mRNA kodiert ein Protein mit 193 Aminosäuren (Miyake et al. 1977).

Während der Produktion und Sekretion von EPO wird eine 27 Aminosäuren lange Leadersequenz, die sich am Aminoende der mRNA befindet, abgetrennt. So entsteht eine Länge von 166 Aminosäuren, von der erneut eine (Arginin), die sich am Carboxyende des mRNA Stranges befindet, abgetrennt wird. Daraus resultiert das im Blut zirkulierende mature, 165 Aminosäuren lange EPO-Protein (Imai et al. 1990).

SCHRIFTTUM

EPO ist ein 30,4 kDa Glycoprotein, welches vier glycosylierte Seitenketten enthält (Abb.2). Drei davon sind N-gebundene und eine ist eine O-gebundene komplexe Oligosaccharidseitenkette. Die N-Bindungen befinden sich an den Positionen 24, 38 und 83 an Aspartylresten, während sich die O-Bindung am Serinrest in der Position 126 befindet (Tsuda et al. 1988). Die O-gebundene Seitenkette hat keine bestimmte Wirkung, die N-gebundenen Seitenketten sind verantwortlich für die adäquate Biosynthese und Sekretion des maturen Erythropoietins (Krantz 1991).

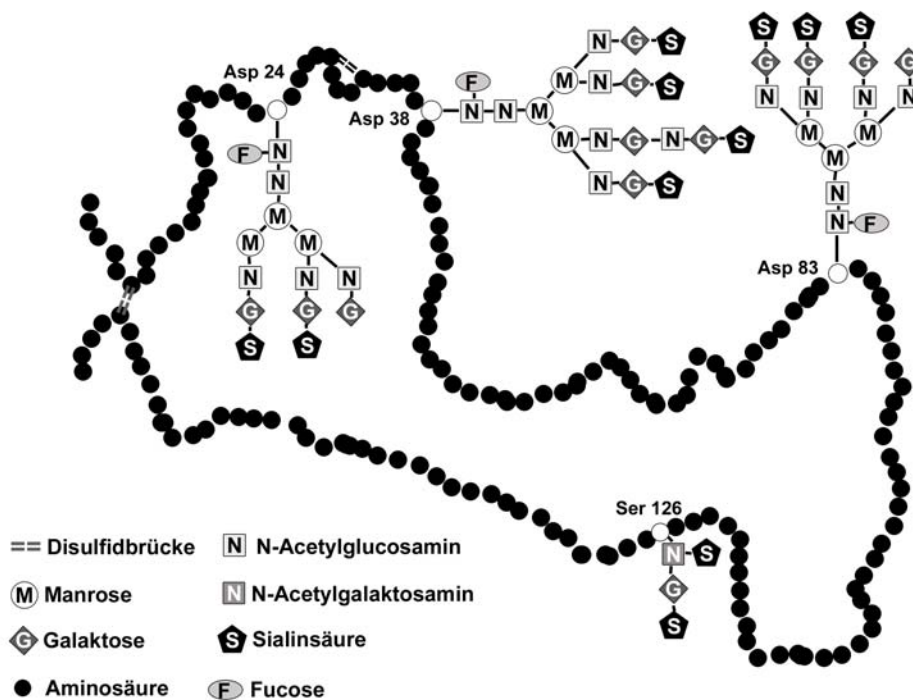


Abbildung 2 : Molekularstruktur des Glykoproteins Erythropoietin

(modifiziert nach (Machnik 2002))

Die biologische Aktivität von EPO wird durch zwei Disulfidbrücken, die sich zwischen Cysteinresten zwischen den Positionen 7 und 160 bzw. 19 und 33 befinden, bestimmt. Es kommt nachweislich durch eine Reduktion dieser Bindungen zu einem Aktivitätsverlust des Erythropoietins (Wang et al. 1985). Die molekulare Masse des adulten EPO-Peptids beträgt 18 kDa (Sasaki et al. 1987).

2.2.2 Organe der Produktion und Expression von Erythropoietin und dessen Rezeptor

Mehrere Studien ergaben, dass die Synthese von EPO im adulten Menschen neben Niere und Leber auch in anderen Organen, wie Gehirn und Uterus stattfindet. Der primäre Produktionsort befindet sich in den peritubulären Interstitiumzellen der Niere (Fisher 2003). Neben diesen wurde auch in peritubulären und tubulären Nierenendothelzellen, so wie in bestimmten Nephronsegmenten cDNA von EPO nachgewiesen (Mujais et al. 1999).

Die Organe mit der zweithöchsten EPO Produktion sind Leber und Uterus. In der Leber produzieren und sekretieren Hepatozyten, Hepatomzellen und Kupfferzellen EPO (Fisher 2003).

Verschiedene Untersuchungen haben herausgefunden, dass sowohl die Plazenta während der Embryonalentwicklung, als auch die Uterusschleimhaut selbst während des physiologischen Zyklus synthetisch aktiv sind (Davis et al. 2003).

Auch innerhalb des Gehirns wurden EPO-Produktion und -Sekretion bei Hasenartigen, Primaten und Menschen nachgewiesen (Chong et al. 2003; Genc et al. 2004). Die Regionen mit der höchsten Syntheseleistung im ZNS sind Hippokampus, Cortex, Mittelhirn, zerebrale Endothelzellen und Astrozyten (Maiese et al. 2004).

Um seine biologische Funktion zu entfalten, muss EPO an einen EPO-Rezeptor (EPOR), der sich auf der Oberfläche verschiedener Zellen befindet, binden. Dieser Rezeptor wurde sowohl in normalen, als auch in transformierten erythroiden Zellen nachgewiesen (D'Andrea and Zon 1990). EPO fördert Proliferation, Differenzierung und das Überleben erythrozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark, indem es an deren Rezeptoren bindet. Weitere Untersuchungen haben herausgefunden, dass sich EPO-Rezeptoren auch auf vielen nicht-erythroiden Blutzelllinien befinden, unter anderem auf myeloiden Zellen, Lymphozyten und Megakaryozyten. Neben diesen wurden auch Rezeptoren auf vielen verschiedenen Nicht-Blutzellen wie Neuronen, Mikroglia, Astrozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Kardiomyozyten, Mesangiumzellen, so wie in bestimmten Zellen von Prostata und Niere entdeckt (Chong et al. 2003; Sasaki 2003; Genc et al. 2004). Weitere Arbeiten haben sogar die Präsenz von EPO-Rezeptoren auf Myelinscheiden in humanen peripheren Nerven dargelegt. Dies weist darauf hin, dass EPO nicht nur im zentralen

SCHRIFTTUM

Nervensystem, sondern auch im peripheren Nervensystem (PNS) eine positive Wirkung auf die Zellentwicklung, so wie zytoprotektive Eigenschaften besitzt (Hassan et al. 2004). Weiterhin werden EPO-Rezeptoren in primären zerebralen Endothelzellen (Chong et al. 2003), in Endothelzellen humaner Umbilicalvenen (HUVECs) und in Kapillaren des Rattengehirns exprimiert (Yamaji et al. 1996).

Verschiedene weitere Studien haben mit Hilfe von radioiodiertem rekombinanten humanem EPO (rhEPO) gezeigt, dass sich ca. 27.000 EPO-Rezeptoren mit einer Affinität von 10^{-9} M auf jeder Endothelzelle befinden (Übersicht EPO-Rezeptoren und die Wirkung von EPO vgl. Tab.1).

EPO scheint weiterhin vor allem hochdosiert den klinischen Verlauf nach einem Schlaganfall zu verbessern. Es wird spekuliert, dass dessen antiapoptotische Eigenschaften in diesem Zusammenhang doch von Bedeutung sind (Ehrenreich et al. 2002).

SCHRIFTTUM

GEWBE	ZELLTYP	WIRKUNG VON EPO
Gehirn	Neurone	Zytoprotektion (durch Reduktion cerebraler ischämischer Schäden wie neuronaler Apoptose, Inflammation, Hirnödem und Infarktgröße im Tiermodell)
	Astrozyten	
	Mikroglia	
Periphere Nerven	Myelinscheiden	Reduktion der spinalen neuronalen Apoptose und Inflammation nach Verletzung des Nervenwurzelganglions
Gefäßsystem	Endothelzellen	Stimulation von Proliferation und Migration der Endothelzellen
Herz	Kardiomyozyten	Verminderung myokardiale Nekrose und Apoptose nach ischämischen Schäden
Niere	Peritubuläre Zellen	Zytoprotektion (durch Reduktion der Apoptose nach ischämischem Schaden)
	Mesangiumzellen	
KM	Erythroide Vorläuferzellen	Steigerung der Zellproliferation und -differenzierung
	EPCs	
	Myeloide Zellen	
	Megakaryozyten	
Gatrinintestinaltrakt	Magenmucosazellen	Steigerung der Zellproliferation
Pancreas	Insulinproduzierende Zellen	nicht näher bekannt
Geschlechtsorgane	Leydigsche Zellen	Stimulation der Testosteronproduktion
Prostata	Prostataepithel	nicht näher bekannt
Brustkrebs	Krebszelllinien MCF-7 und BT549	Stimulation der Zellproliferation

Tabelle 2 : EPO-Rezeptoren und die Wirkung von EPO in verschiedenen Geweben (Chong et al. 2002; Genc et al. 2004; Fliser et al. 2006)

2.2.3 Der Erythropoietinrezeptor und Erythropoietininduzierte Gentranskription

Die größte Dichte von EPORen befindet sich auf der Oberfläche von colony-forming-unit (CFU) Erythrozyten und Pronormoblasten (Sawyer et al. 1987; Sawada et al. 1990). Die Anzahl der Rezeptoren pro Zelle reduziert sich während der Zelldifferenzierung. Diverse Studien haben gezeigt, dass Retikulozyten und reife Erythrozyten keine EPO-Rezeptoren mehr besitzen (Sawyer et al. 1987; Sawada et al. 1990; Wickrema et al. 1992) .

Der EPO-Rezeptor (Abb.3) ist ein monomeres Protein mit einem Gewicht zwischen 66 und 78 kDa (Remy et al. 1999). Die Bindung von EPO an seinen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und daraus resultierender Dimerisierung der beiden monomeren Anteile des Rezeptors (Philo et al. 1996). An der extrazellulären Domäne des Rezeptors wurde eine Bindungsstelle mit hoher (kD ca. 1 nM) und eine mit niedriger Affinität (kDa ca. 2 μ M) für EPO nachgewiesen (Philo et al. 1996).

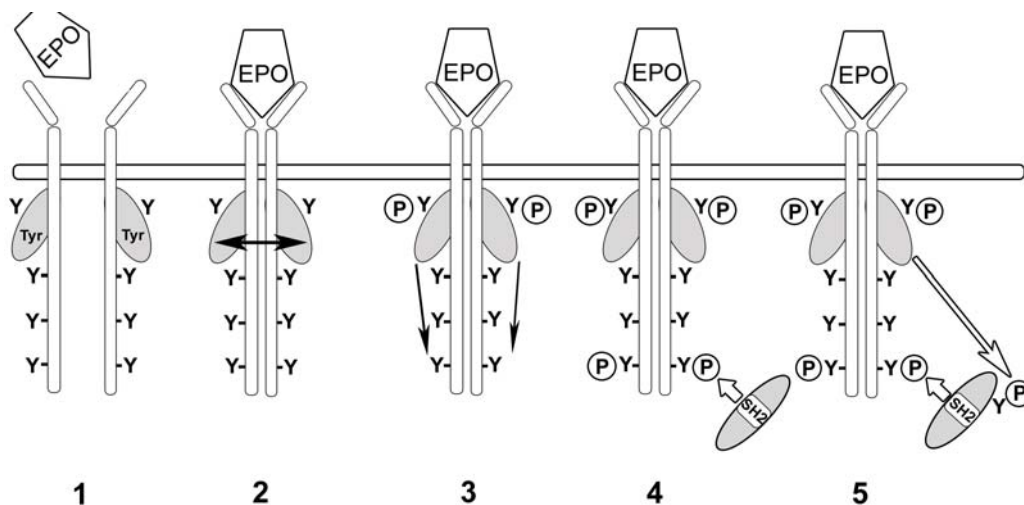


Abbildung 3 : Struktur des EPO-Rezeptors

*EPO-Rezeptor; der erste Schritt in der Aktivierung des EPO-R ist die Dimerisation, (1) darauf folgt die Transphosphorylation (2); die Tyrosinreste des EPO-Rezeptors werden dann phosphoryliert (3,4) und exprimieren Bindungsstellen für IZR Signalproteine mit SH2-Domänen (5).
(modifiziert nach (Fisher 2003))*

Durch die Bindung des Liganden (EPO) und die daraus resultierende Dimerisierung wird eine, an die transmembrane Domäne des Rezeptors assoziierte,

tyrosinspezifische Proteinkinase, die Januskinase 2 (JAK2), durch Autophosphorylierung aktiviert (Abb.4) (Constantinescu et al. 2001; Kubatzky et al. 2001). Die JAKs phosphorylieren aber nicht nur sich selbst, sondern auch acht Tyrosinreste der zytoplasmatischen Rezeptordomäne. Über diese binden als STATs (signal transducers and activators of transcription) bezeichnete Transkriptionsfaktoren an die Tyrosylphosphate. Die STAT Familie besteht aus sieben Mitgliedern, die alle eine SH2 Domäne am Carboxyende, eine SH3-ähnliche Domäne und eine DNA-Bindungsstelle in ihrer mittlere Region besitzen. Durch die Tyrosinphosphorylierung des Carboxyterminals der STATs erlangen diese ihre Fähigkeit über ihre SH2 Domänen zu dimerisieren und passieren anschließend in den Zellkern, wo sie die Transkription spezifischer Gene aktivieren (Miura et al. 1991).

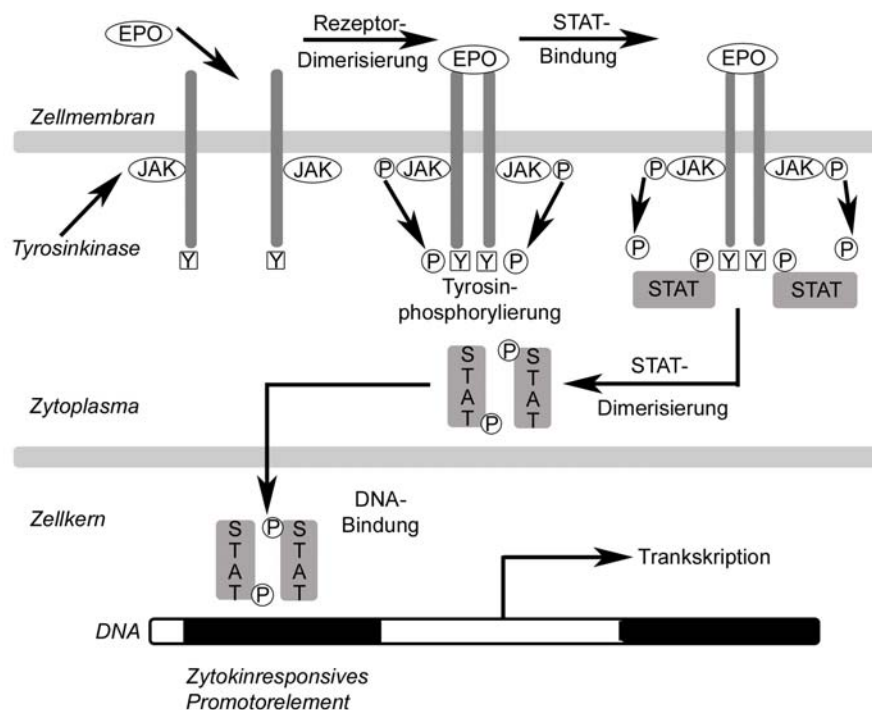


Abbildung 4 : JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade

(modifiziert nach.(Bode 2007))

Die durch EPO induzierte Gentranskription kann über den Mechanismus eines negatives Feedbacks wieder vermindert bzw. beendet werden. Durch die

Tyrosinphosphorylierung der distalen Region des EPO-Rezeptors werden Bindungsstellen für Phosphatreste hämatopoietischer Zellen (HCP) freigegeben (Broudy et al. 1991; Beck et al. 1993). Durch die Bindung der hämatopoietischen Zellen an den EPO-Rezeptor wird die JAK2 dephosphoryliert und dadurch inaktiviert, was wiederum zu einer Unterbrechung der Signaltransduktionskaskade führt und die ligandeninduzierte Transkription hemmt (Broudy et al. 1991).

Neben der Transkriptionsinduktion über die JAK-STAT-Kaskade kann EPO noch über den Calcium/PKC Weg oder die MAPK/ERK Signalkaskade wirken.

Die PKC (Protein-Kreatinin-Kinase) Familie besteht aus drei Gruppen, die wiederum 11 PKC Isoenzyme enthalten. Zwei dieser Gruppen, die klassische (PKC- α , β_I , β_{II} und γ) und atypische (PKC- ζ , μ und ι/λ) beeinflussen die Überlebenskapazität der Zellen und hemmen Apoptose. Die dritte Gruppe, die neuen PKC Isoenzyme (PKC- δ , η , ϵ und θ) haben eine proapoptotische Funktion. Die klassischen oder „kalzium-abhängigen“ Isoenzyme benötigen Ca^{+} für ihre Aktivierung, die Neuen und die Atypischen sind Ca^{+} unabhängig (Deacon et al. 1997; Cross et al. 2000). PKC reguliert die durch EPO induzierte Proliferation und Differenzierung von erythroiden Zellen. PKC- α wurde als einziges Ca^{+} abhängiges Isoenzym identifiziert, welches in erythroiden Progenitorzellen exprimiert wird und an der durch EPO induzierten Differenzierung von CD34+ Zellen beteiligt ist (von Lindern et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Transkriptionsinduktion erfolgt über die MAPK/ERK Signalkaskade. Die MAPKs (mitogenaktivierte Proteinkinasen) sind Serin-/Threoninkinasen, zu denen extrazelluläre Signalkinasen (ERKs), die c-Jun Aminoendekinasen (JNKs) und die p38 MAP Kinase gehören. Diese Kinasen stellen in der Regel die letzten Schritte von Signalkaskaden dar, die entweder durch Überlebensfaktoren (survival factors) oder durch Tod überbringende Rezeptoren (death promoting receptors) aktiviert werden. Nach dieser Aktivierung translozieren sich die MAPKs in den Zellkern, um dort die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren, die wiederum Zelldifferenzierung, Zellwachstum oder Zelltod vermitteln. Die ERK Kaskade beeinflusst primär die Regulation der Apoptose, kann aber auch zytoprotektiv sein, vor allem wenn sie über die ERK1/2 Kaskade induziert wird (Remy et al. 1999). Die Aktivierung von JNK und p38 hängt mit der Apoptoseinduktion während der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und mit der Applikation von Zytokinen, die die Entzündungsreaktionen fördern, zusammen (Suzuki et al. 2000; Rossler et al. 2004). In neuronalen Zellen und ECs, die oxidativem Stress

ausgesetzt sind, wird die Aktivierung von p38 und JNK durch apoptotische Zellen beeinflusst (Bagnard et al. 2004; Cao et al. 2004).

Die Aktivierung von MAPKs kann aber auch zu Zytoprotektion führen. EPO ist in der Lage MAPKs zu phosphorylieren und dadurch die Aktivität von p38 und JNK zu steigern. Diese Aktivitätssteigerung führt zu Proliferation und Differenzierung von erythroiden Zellen (Jacobs-Helber et al. 2000).

2.2.3 Hypoxieinduzierte EPO Synthese

Die Synthese des EPO-Gens wird durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck im Blut induziert. Eine verminderte Menge der Erythrozyten im peripheren Blut dagegen beeinflusst die Synthese nicht. Sobald ein hypoxischer Zustand im Organismus entsteht, wird EPO in das periphere Blut freigesetzt. Von hieraus gelangt es ins Knochenmark, wo es an EPO-Rezeptoren bindet, welche sich auf der Oberfläche von erythroiden Progenitorzellen befinden und stimuliert dadurch die Erythropoiese (Broudy et al. 1991). Daraus folgt ein Anstieg der Gesamterythrozytenzahl und eine damit zusammenhängende Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Organismus (Fisher 2003).

In den meisten Organen wird die hypoxieabhängige Expression von EPO und seinem Rezeptor primär durch HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) reguliert. HIF-1 ist ein alpha/beta heterodimeres Protein, welches durch eine Vielzahl von Stressoren, unter anderem durch Hypoxie, aktiviert wird (Hewitson et al. 2004).

Die Gentranskription wird über einen Enhancer vermittelt, welcher sich am 3'-Ende des EPO Gens befindet und eine spezielle Bindungsstelle für HIF-1 darstellt (Wang and Semenza 1995). HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor mit helix-loop-helix-Struktur. Er besteht aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α und HIF-1 β . HIF-1 β ist die kleinere, sauerstoffunabhängige 91-94 kDa Untereinheit und wurde schon früher als „aryl receptor nuclear translocator“ (ARNT) beschrieben (Hoffman 1991). HIF-1 α ist die größere, sauerstofflabile 120 kDa Untereinheit, die unter normoxischen Bedingungen abgebaut wird. Bei Hypoxie wird der Abbau von HIF-1 α über die Blockierung des Hippel-Lindau Proteins, welches den Abbau katalysiert, gehemmt (Maxwell et al. 1999). HIF-1 α dringt in den Zellkern ein und verbindet sich dort mit

HIF-1 β zu einem Heterodimer, dem stabilen HIF-1 α Komplex. Dieser Komplex bindet an eine vorgesehene Region (5'-RCGTG-3') in der Nähe des 5' Endes der hypoxieresponsiven Enhancerregion des EPO Gens, wodurch der Enhancer aktiviert und die EPO-Transkription gesteigert wird (Bunn et al. 1998).

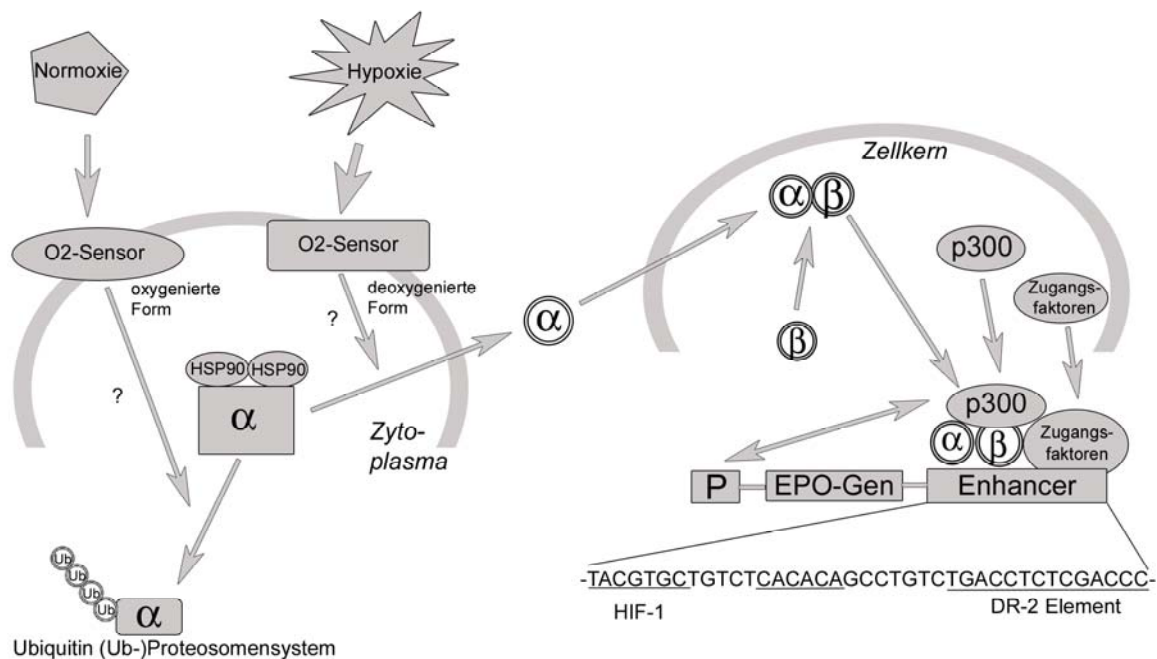


Abbildung 5 : Regulation der Expression des EPO Gens

(modifiziert nach.(Sasaki et al. 2000))

Eine verminderte O₂ Sättigung ist aber nicht der einzige Faktor, der die Produktion von EPO beeinflusst. Im weiblichen Genitaltrakt wurde eine östrogenabhängige EPO-Produktion festgestellt. So führt die Gabe von 17 β -Östradiol (E₂), welches die Entwicklung des Endometriums im physiologischen Zyklus kontrolliert, zu einem vorübergehenden rapiden Anstieg von EPO-mRNA im Uterus (Yasuda et al. 1998). Ein hypoxieinduzierter Anstieg von EPO-mRNA konnte nur bei Vorhandensein von E₂ gemessen werden. Die EPO-Produktion im Ovidukt und in den Ovarien ist ebenfalls E₂-abhängig (Masuda et al. 2000).

Auch anämischer Stress und die Freisetzung von Insulin können zu einer gesteigerten Produktion von EPO und dessen Rezeptoren in neuronalen und

nichtneuronalen Zellen führen. Eine Senkung der EPO Produktion wird durch verschiedene andere Zytokine, unter anderem Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) reguliert (Nagai et al. 2001).

2.2.4 Eigenschaften von EPO

2.2.4.1 Regulation der Erythropoiese

Die Produktion der roten Blutzellen (Erythropoiese) wird von verschiedenen Zytokinen reguliert. In Abb.6 wird die Erythropoiese von der primitiven pluripotenten

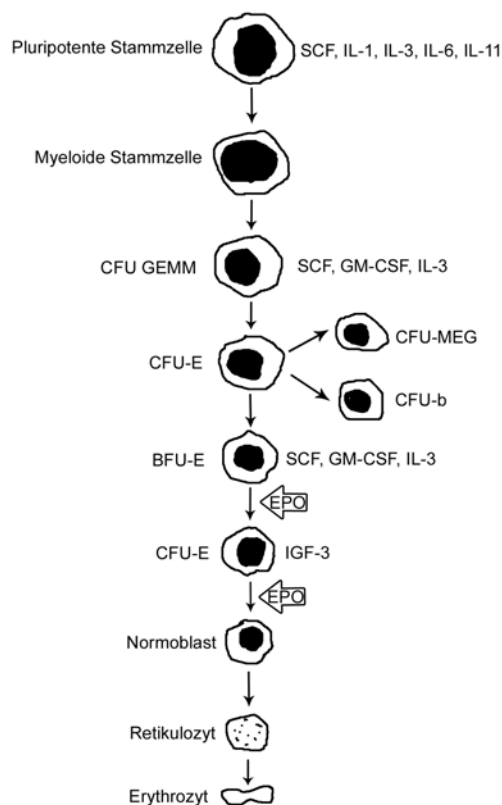


Abbildung 6 : Erythropoiese beeinflussende Wachstumsfaktoren

(modifiziert nach (Fisher 2003))

Stammzelle bis zum murenen Erythrozyten dargestellt. Die daran beteiligten bekannten Wachstumsfaktoren sind G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), IL-6, SCF (stem cell factor), IL-1, IL-3, IL-4, IL-9, IL-11, GM-CSF (granulozyte-macrophage-CSF), IGF-1 (insulin growth factor-1) und EPO. Im Gegensatz zu den meisten anderen Wachstumsfaktoren beeinflusst EPO im KM vor allem die späteren Entwicklungsstadien der erythroiden Vorläuferzellen. Es wirkt primär auf die CFU-E (erythroide colony-forming units) und bewirkt die Proliferation und Reifung dieser Zellen von Normoblasten über Retikulozyten zu reifen Erythrozyten (Gregory

and Eaves 1978). EPO wirkt synergistisch mit SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9, und IGF-1 und senkt dadurch primär die Apoptoserate der erythroiden Vorläuferzellen im Knochenmark (Lin et al. 1996).

2.2.4.2 Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass auch reife Endothelzellen EPO-Rezeptoren exprimieren und EPO die Anzahl der Endothelzellen in vitro fördern kann (Anagnostou et al. 1990; Anagnostou et al. 1994). Die Tatsache, dass sowohl endotheliale, als auch hämatogene Zellen auf EPO ansprechen, ist auf eine gemeinsame Vorläuferzelle, den Hämangioblasten, zurückzuführen. EPO erhöht signifikant die Mobilisierung der zirkulierenden EPCs in in vivo Experimenten (Heeschen et al. 2003) und stimuliert die Mobilisierung von CD34+/CD45+ zirkulierenden EPCs im peripheren Blut beim Menschen (Bahlmann et al. 2004). Einige klinische Studien haben EPO als einen unabhängigen Faktor identifiziert, der die Anzahl und die Funktion von CD34+ Zellen und des VEGF-Rezeptors 2 bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit vorhersagen kann (Heeschen et al. 2003). Es besteht also eine Korrelation zwischen EPO-Serumwerten und der im Knochenmark vorhandenen Anzahl von CD34+/CD133+ hämatopoietischen Stammzellen bei betroffenen Patienten. Diese Daten suggerieren, dass EPO eine wichtige physiologische Determinante für die Mobilisierung von EPCs ist. Die Potenz, mit der EPO EPCs aus dem Knochenmark mobilisiert ist sogar vergleichbar mit der Wirkung des bekannten, sehr potenten EPC-Mobilisators VEGF (Bahlmann et al. 2004).

2.2.4.3 Antiapoptotische Effekte und Zytrotektion

Durch EPO vermittelte Zytrotektion bei oxidativem Stress schließt den Schutz vor Apoptose ein, die durch verschiedene Insulte wie ein reduzierter O₂ Partialdruck, die Einwirkung verschiedener exogener Toxine und die Exposition zu freien Radikalen verursacht werden kann.

Apoptose ist der programmierte Zelltod und sie ist durch Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und darauf folgende DNA-Fragmentierung charakterisiert (Majno and Joris 1995). Dieser Effekt findet bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen statt und stellt ein Gleichgewicht zwischen Zellauf- und Zellabbau dar. Apoptose wurde vor allem in Geweben mit einer hohen Proliferationsrate, wie Mammagewebe nach Laktation, während der Atresie der

Ovarfollikel, oder in präneoplastischen Geweben beschrieben (O'Shea et al. 1978; Marti et al. 1994). Es gibt viele Faktoren, die die Apoptose in den verschiedenen Zelltypen beeinflussen können. Unter anderem sind dies IL-3, IGF-1 (insulin-like growth factor-1) und EPO (Koury and Bondurant 1990; Williams et al. 1990).

Es wurde unter anderem nachgewiesen, dass eine Zufuhr von EPO während einer Hypoxie die Überlebensrate von kultivierten Hippokampusneuronen signifikant erhöhen kann (Morishita et al. 1997; Chong et al. 2003). Andere Studien haben gezeigt, dass EPO eine zytoprotektive Wirkung bei externer Stickstoffmonoxid(NO)exposition oder bei endothelialer Produktion von NO zeigt, indem es die Stabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht (Wang and Vaziri 1999; Chong et al. 2003).

Es sind mehrere Prozesse bekannt, die zu Apoptose führen. Einer davon ist der Verlust der Integrität der Zellmembran durch eine Asymmetrie der Membranphospholipide (PS). Die PS-Reste werden an die Oberfläche der Zelle transferiert und wirken als Phagozytosesignal. Im Nervensystem ist die Expression von externen PS-Resten das Signal für Mikroglia, Zellen zu phagozytieren (Hoffmann et al. 2001; Kang et al. 2003). Eine zusätzliche Rolle spielt die Translokation von PS-Resten an die Zelloberfläche bei vaskulären Zellen. Die PS-Expression auf Endothelzellen bewirkt die Bildung einer prokoagulatorischen Oberfläche, wo sie zur Aktivierung einer Koagulationskaskade führt (Maiese and Vincent 2000; Fadok et al. 2001).

Ein weiterer Prozess, der zu Apoptose führt, ist die Spaltung der DNA in einzelne Fragmente. Dies findet, im Gegensatz zur Externalisation der PS-Reste, erst spät im Verlauf der Apoptose statt (Maiese and Vincent 2000).

Die Applikation von EPO während einer Gewebsverletzung kann die Exposition von PS-Resten und die DNA-Zerstörung verhindern (Grimm et al. 2002; Campana and Myers 2003). Dadurch wird deutlich, dass EPO eine frühe zytoprotektive Wirkung besitzt, indem es die Expression von PS-Resten an die Zelloberfläche verhindert, aber gleichzeitig auch noch im späteren Verlauf des Apoptoseprozesses durch Inhibition der DNA Frangmentierung eingreifen kann. Gleichzeitig wird die Bildung von einer prokoagulatorischen Oberfläche auf Endothelzellen verhindert (Witting et al. 2000; Kang et al. 2003).

Eine weitere zytoprotektive Wirkung wird über den bereits genannten PKC-Weg induziert, wobei die Aktivität der klassischen PKC-Isoenzyme Ca^{+} abhängig ist. In

früheren Studien wurde nachgewiesen, dass EPO einen rapiden Anstieg der intrazellulären (IZR) Ca^{+} Konzentration in mononukleären Knochenmarkszellen verursachen kann (Mladenovic and Kay 1988). Eine andere Studie hat gezeigt, dass EPO spannungsabhängige Ca^{+} Kanäle vom T-Typ aktiviert (Assandri et al. 1999). Weiterhin ist EPO in der Lage das intrazelluläre Ca^{+} und die intrazelluläre Monoaminkonzentration in neuronalen Zellen eines Phäochromozytoms zu erhöhen (Masuda et al. 1993). Diese Arbeiten haben deutlich gemacht, dass EPO dazu fähig ist, die intrazelluläre Ca^{+} Konzentration zu erhöhen, sei es über spannungsabhängige Ca^{+} -Kanäle oder über extrazelluläre Quellen. Wahrscheinlich ist ein rapider, vorübergehender Anstieg der intrazellulären Ca^{+} Konzentration notwendig, um die Zelle vor diversen exotoxischen Agentien zu schützen, da gezeigt wurde, dass ein Abfall des intrazellulären Ca^{+} nachweislich die durch EPO vermittelte Zytoprotektion in Anwesenheit von Glutamat unterdrückt (Maxwell et al. 1999). Masuda et al und Koshimura et al haben weitere Studien über EPO durchgeführt und festgestellt, dass EPO wahrscheinlich die neuronale Überlebensfähigkeit steigern kann, indem es die Konzentration des freien Ca^{+} im Zytosol anhebt und durch die Aktivierung der Ca^{+} Kanäle das Membranpotential aufrechterhält (Masuda et al. 1993; Koshimura et al. 1999)

2.2.4.4 Angiogenese und Vaskulogenese

EPO ist bekannt als einer der Hauptregulatoren der embryonalen Angiogenese und Organogenese. EPO-Rezeptoren wurden in nahezu allen embryonalen Geweben nachgewiesen (Juul et al. 1998; Kertesz et al. 2004). Kertesz et al haben herausgefunden, dass EPO und dessen Rezeptoren während der Embryogenese in den Gefäßen exprimiert werden. So entwickeln EPO-/- knockout Tiere angiogene Defekte, die letale Phänotypen zur Folge haben. Diese Effekte können durch externe Zufuhr von humanem EPO vermindert werden (Kertesz et al. 2004).

EPO besitzt eine direkte biologische Wirkung auf reife Endothelzellen. Neben der Stabilisierung endothelialer Strukturen und der Gefäßintegrität werden Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte gefestigt (Fliser et al. 2006). Dadurch sind diese weniger anfällig für ischämieinduzierten Zelltod (Carlini et al. 1995).

EPO scheint auf Endothelzellen sowohl mitogene, als auch chemotaktische Effekte zu haben. In kultivierten humanen und bovinen Endothelzellen stimuliert EPO nicht nur die Zellproliferation, sondern fördert auch deren Migration (Anagnostou et al. 1990). In neonatalen mikromesenterialen Endothelzellen induziert EPO die Vaskulogenese (Ashley et al. 2002). Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass auf Matrigel kultivierte endotheliale Zellen unter Einwirkung von EPO verästelte Hohlraumstrukturen gebildet haben. Weiterhin kann EPO bei endothelialen Zelllinien zur Produktion von MMP-2, Zellproliferation und Gefäßbildung führen (Ribatti et al. 1999).

In klinischen Studien wurde die EPO-abhängige Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark nachgewiesen. Damit zusammenhängend kann EPO die postnatale Vaskulogenese durch eine Steigerung der Anzahl und eine Verbesserung der Funktion von EPCs beeinflussen (Heeschen et al. 2003).

2.2.4.5 Antiinflammatorische Wirkung von EPO nach Myocardinfarkt

Liu et al haben die Entzündungsreaktion nach Myokardinfarkt am Ischämie/Reperfusionsmodell bei der Ratte untersucht. Dabei haben sie demonstriert, dass durch Ischämie/Reperfusion zwei myokardiale, redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, NF- κ B (nuclear factor- κ B) und AP-1 (Aktivatorprotein-1) aktiviert und eine hochgradige Entzündungsreaktion induziert wurde. Hierbei sind NF- κ B und AP-1 die Hauptregulatoren der Inflammation. Die kardioprotektive Wirkung von EPO gegen durch Ischämie/Reperfusion induzierte Insulte könnte aus der Suppression der Entzündungsantwort über die Senkung von NF- κ B und AP-1 resultieren (Liu et al. 2006).

Durch einen Myokardinfarkt entsteht ein Untergang von Myozyten und Endothelzellen, welcher durch eine komplexe Interaktion verschiedener Zytokine und Adhäsionsmoleküle, die durch die Reperfusion aktiviert werden, induziert wird. Viele Studien legen dar, dass TNF- α eines der Hauptzytokine ist, welches die Zytokinkaskade triggert und die Entzündungsreaktion initiiert (Sack et al. 2000). Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) ermöglicht sowohl die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in reperfundiertes Myokard, als auch deren adhäsionsvermitteltes zytotoxisches Verhalten, was den Zelltod von

Kardiomyozyten zur Folge hat. Die Induktion von ICAM-1 im reperfundierten Myokard wird von TNF- α und IL-6 reguliert. Möglicherweise können diese beiden Faktoren die Interaktionen zwischen transmigrierten neutrophilen Granulozyten und Herzmuskelzellen beschleunigen. Diese Interaktion, zusammenhängend mit der Akkumulation der Neutrophilen, bestimmt den Grad der Zerstörung der Kardiomyozyten (Frangogiannis et al. 2002), was die wichtige Rolle, die proinflammatorischen Mediatoren im ischämischen Myokard spielen, demonstriert. Damit zusammenhängend zeigt die Studie von Liu et al, dass die mit rhEPO behandelte Gruppe eine signifikante Reduktion der Expression von myokardialen proinflammatorischen Mediatoren und eine verminderte Gewebsinfiltration von neutrophilen Granulozyten aufweist (Liu et al. 2006), was die kardioprotektive Wirkung von EPO erneut unterstreicht.

2.2.4.6 Kardioprotektive Wirkung von EPO

Kardioprotektive Eigenschaften von EPO wurden sowohl in vitro, als auch in vivo festgestellt. Neben der Aufrechterhaltung geschädigter Endothelzellen und der Vakulogeneseinduktion in ischämischen Geweben, beeinflusst EPO auch direkt Kardiomyozyten. Diese Wirkung wird über den EPO-Rezeptor und die PI3/Akt Signaltransduktionskaskade vermittelt (Parsa et al. 2003; Cai and Semenza 2004). Calvillo et al kultivierten in einer Studie aus Rattenherzen isolierte Kardiomyozyten und setzten diese einer hypoxischen Umgebung aus. Bei den Zellen, bei denen vor der Hypoxie rhEPO zum Kulturmedium zugesetzt wurde, konnte eine Reduktion der Apoptoserate um 50% festgestellt werden (Calvillo et al. 2003). In einer ähnlichen Studie untersuchten Parsa et al die Apoptoserate kultivierter Kardiomyozyten unter hyp- und anoxischen Bedingungen. In diesem Zusammenhang konnten sie die Relevanz der PI3K/AKT-Signalkaskade bei der durch rhEPO vermittelten Protektion der Kardiomyozyten nachweisen, da die Wirkung von rhEPO durch einen PI3K/AKT-Inhibitor aufgehoben wurde (Parsa et al. 2003). Die genauen, durch die PI3K/AKT-Signalkaskade entstehenden Effekte sind noch nicht nachgewiesen, jedoch ist es am wahrscheinlichsten, dass es über die Phosphorylierung der endothelialen Stickstoffoxid-Synthetase zu einem Anstieg der Stickstoffmonoxidproduktion und

dadurch zu einer Hemmung der proapoptotischen Caspasen, wie Caspase-3 oder Caspase-9 kommt (Fliser et al. 2006).

Mittlerweile wurde in zahlreichen Studien die kardioprotektive Wirkung von intravenös (i.v.) verabreichtem rhEPO nach künstlich induziertem Myokardinfarkt am Ischämie/Reperusionsmodell untersucht (Calvillo et al. 2003; Parsa et al. 2003; Tramontano et al. 2003; Cai and Semenza 2004). Unter anderem demonstrierten Parsa et al, dass die exogene intravenöse Zufuhr von EPO sowohl vor, als auch während der Ischämiephase vor Apoptose der Kardiomyozyten schützt und die Infarktgröße vermindert, was in einer verbesserten Funktion des linken Ventrikels (LV) resultiert und die Wiederherstellung der Herzleistung, inklusive der linksventrikulären Kontraktion, verbessert (Parsa et al. 2004). Tramontano et al applizierten EPO genau zum Zeitpunkt der Okklusion, was zu einer signifikanten Verminderung der Apoptoserate im Zentrum der myokardialen Ischämie führte (Tramontano et al. 2003). Crivellato et al zeigten 2004, dass EPO nach Myokardinfarkt das mikrovaskuläre Wachstum im Herzmuskel fördern kann, woraus sich schließen lässt, dass dessen kardioprotektive Wirkung im ischämischen Myokard unter anderem aus einer gesteigerten Vaskulogenese und der damit verbundenen besseren Blutversorgung des Myokards resultiert (Crivellato et al. 2004).

Neben der oben schon beschriebenen Wirkung von EPO auf die bei Patienten mit Herzversagen häufig vorliegende Anämie und die vaskulogenen Effekte hat EPO auch eine direkte Wirkung auf myokardiale Zellen. Daraus resultierend wird EPO als adäquates Medikament für Patienten mit primärer Anämie oder mit einer Anämie verbundenem Herzversagen beschrieben. Frühere Studie haben gezeigt, dass die Applikation von rhEPO bei Patienten mit kongestivem Herzversagen, welches im Zusammenhang mit einer Anämietherapie entstand zu einer geringeren Hypertrophie des linken Ventrikels, zu einer Inhibition der linksventrikulären Dilatation, zu einer Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF), des Schlagvolumens und des kardialen Outputs führt (Low-Friedrich et al. 1991; Goldberg et al. 1992). Andere in vivo Studien illustrierten, dass die Behandlung mit EPO in neonatalen Ratten zu einer kardialen Zellproliferation, zu einer reduzierten Apoptoserate bei Kardiomyozyten nach Ischämie/Reperfusion und zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion führte (Calvillo et al. 2003; Moon et al. 2003; Parsa et al. 2003).

Auch klinische Studien an Patienten mit kongestivem Herzversagen haben deutlich gemacht, dass EPO in Kombination mit i.v. verabreichtem Eisen in einer Verbesserung der LVEF und in einer um fast 80% kürzeren Zeit des stationären Aufenthaltes der Patienten resultiert (Silverberg et al. 2001).

Als Fazit aus den oben genannten Studien kann geschlossen werden, dass EPO bei akuten und chronischen Herzerkrankungen als zytoprotektives Medikament verwendet werden kann, welches die Überlebensrate und die Zellproliferation von Kardiomyozyten steigert, den myokardialen Blutfluss verbessert und die Herzfunktion steigert.

2.2.4.7 Potentielle Nebenwirkungen

rhEPO ist als ein äußerst sicheres Medikament bekannt, welches innerhalb der letzten zehn Jahre bereits mehreren Millionen Menschen zur Anämietherapie verabreicht wurde. Trotzdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass auch einige Nebenwirkungen bei der Verabreichung von rhEPO auftreten können, vor allem, wenn es nicht-anämischen Patienten verabreicht wird. EPO hat, ähnlich wie VEGF, eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese, jedoch lockert EPO im Gegensatz zu VEGF nicht die tight-junctions zwischen den Endothelzellen und führt deswegen nicht zu Verletzungen des Kapillarendothels (Martinez-Estrada et al. 2003).

Im Gegensatz zur Therapie von Anämien benötigt man bei der systemischen Verabreichung von rhEPO zur Unterstützung der Gewebsregeneration bei ischämischen Insulten wesentlich höhere Dosen, um dieses Ziel zu erreichen. Obwohl hier eine akute Gabe von rhEPO keine Nebenwirkungen zu erzeugen scheint, provoziert eine chronische Gabe über einen längeren Zeitraum dagegen zumindest einen Anstieg der Gesamterthrozytenmasse im peripheren Blut. Dies ist in Hinsicht auf die rheologischen Eigenschaften des Blutes nicht wünschenswert und kann Gewebsschädigung noch verschlimmern (Ehrenreich et al. 2002). Klinische Studien zur Schlaganfalltherapie haben gezeigt, dass bei dreimaliger rhEPO Gabe in der hohen Dosis kein Anstieg der Hämoglobinkonzentration nachgewiesen werden konnte (Ehrenreich et al. 2002).

Weiterhin muss die dosisabhängige Beeinflussung der Anzahl und der Aktivität der Thrombozyten und die Stimulation der Plättchenadhäsion an verletzten oder auch nicht verletzten Endothelien beachtet werden, da dies die positiven Effekte, die EPO auf geschädigte Gewebe bewirkt, wiederum negativ beeinflussen könnte (Stohlawetz et al. 2000; Fuste et al. 2002). Bei den meisten Tierversuchen an Ratten wurde eine Dosis von 500 IU/kg KG rhEPO verwendet, was einer Gesamtdosis von 35.000 IU pro 70kg Mensch entspricht. Eine Dosis in dieser Höhe ist aber nur krzzeitig klinisch vertretbar, da sie bei dauerhafter Gabe zu Bluthochdruck, Gefäßthrombosen, und schlimmstenfalls zu Todesfällen, verursacht durch den rapiden Anstieg des Hämatokrits und der Thrombozytenaktivität, führen kann (Wolf et al. 1997; Besarab et al. 1998).

2.3 Reperfusionssyndrom

2.3.1 Apoptose und Nekrose

Der durch artherosklerotische Plaques hervorgerufene Verschluss von Koronararterien verursacht einen reduzierten myokardialen Blutfluss, welcher zu einer Schädigung, bis hin zu Nekrose von Kardiomyozyten führen kann (Braunwald and Kloner 1985; Koren et al. 1985).

Es ist bekannt, dass die Reperfusion einer verschlossenen humanen Koronararterie, im Gegensatz zu einer permanenten Okklusion des Gefäßes, die Infarktgröße vermindern, die linksventrikuläre Funktion verbessern und die Mortalitätsrate der Patienten senken kann (Braunwald and Kloner 1985; Koren et al. 1985). Trotz dieser Tatsache wurde nachgewiesen, dass die Zufuhr von oxygeniertem Blut in vormals ischämische Gebiete eine Kaskade von Insulten auslösen kann, die paradoxerweise zu zusätzlicher Zellschädigung und -nekrose führen. Dieses Phänomen wird „Reperfusionssyndrom“ genannt und kann sich entweder als reversible kardiale Dysfunktion oder als irreversibler Schaden der Kardiomyozyten manifestieren (Simpson et al. 1987; Hansen 1995).

Ischämieperioden, die länger als 20 min dauern, führen auf Grund von Zellverlust durch Apoptose und Nekrose immer zu einer irreversiblen Schädigung des Herzens. Apoptose ist der kontrollierte Zelltod, eine aktive, genetisch determinierte, enzym-

und energieabhängige Form des Zelluntergangs, welcher ohne entzündliche Reaktionen stattfindet. Sie kommt hauptsächlich während der Embryogenese, in der Homeostase des Immunsystems und der Erythropoiese, so wie nach Erlöschen der Wirkung stimulierender Wachstumsfaktoren vor. Die Apoptose wird durch die Gene bcl-2, bcl-x(long), ced-9 und E1B gehemmt und von bax, bcl-x(short), ced-3, ced-4, c-mys, c-fos, c-jun und p53 stimuliert. Die zur Apoptose führenden Mechanismen differieren in den verschiedenen Zelltypen. Gemeinsam ist die Aktivierung von Endonukleasen, die zur internukleosomalen DNA-Fragmentierung führt. Sie kann durch endogene Proteasen (z.B. zytotoxische T-Lymphozyten) und Zytokine ausgelöst werden (Wiesner 2000).

Die Induktion der Apoptose bei Kardiomyozyten wird durch einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg gesteuert (Cai et al. 1998; Bialik et al. 1999). Der extrinsische Weg ist bcl-2 unabhängig und wird durch Transduktionssignale der TNF Superfamilie aktiviert (Vaux and Strasser 1996; Neuss et al. 2001). Er wird durch die Aktivierung von membrangebundenen Todesrezeptoren, wie Fas durch spezifische Fas Liganden (FasL) in Gang gesetzt, die wiederum Todesdomäne-assoziierte Proteine (FADD) aktivieren. Die FADD-Komplexe führen über eine proteolytische Spaltung und Aktivierung von pro-caspase-8 zu einer Aktivierung der zellulären Apoptosekaskade (Nagata 1997).

Der intrinsische Weg besteht aus Signalkaskaden, die von verschiedenen anderen Stimuli innerviert werden und wird sehr potent durch bcl-2 gehemmt. Der Hauptregulator des intrinsischen Weges scheint das Mitochondrium zu sein (Green and Reed 1998). Hierbei kommt es durch eine Erschöpfung der zellulären ATP-Depots zur Translokation des bax-Proteins aus dem Zytosol in die äußere mitochondriale Membran. Diese Translokation führt zu einer mitochondrialen Dysfunktion und Schwellung und induziert den Ausstrom von Cytochrom c in das Zytosol. Dieser Ausstrom erfolgt durch einen Mechanismus, der zu einer Öffnung von „Transitionsporen“ der inneren Mitochondrienmembran führt oder durch eine Hyperpolarisation und dadurch bedingte Schwellung des Mitochondriums, was eine Ruptur der äußeren Membran zur Folge hat. Das sich im Zytosol befindende Cytochrom c aktiviert nun verschiedene Caspasen, die wiederum Apoptosesignale induzieren (Susin et al. 1996; Kluck et al. 1997).

Die Nekrose dagegen wird durch externe Insulte wie Ischämie, Trauma und Thrombosen, die zu einem unmittelbaren Zelltod führen hervorgerufen und geht

immer mit einer Entzündung einher. Sie ist durch morphologische Veränderungen der Zelle und den dadurch bedingten irreversiblen Ausfall der Zellfunktion gekennzeichnet. Im Zytosol sind Zellkernveränderungen (Pyknose, Karyorhexis und Karyolyse) inklusive eines unspezifischen Abbaus der DNA zu erkennen. Es folgt eine Denaturierung und Koagulation der zytoplasmatischen Proteine, ein Zusammenbruch der gesamten Zellorganelle, eine Zellschwellung und -ruptur. Das umliegende Gewebe wird deutlich von Leukozyten infiltriert (Hildebrandt 1998).

2.3.2 Intrazelluläre Veränderungen nach Ischämie, Reperfusion

Kardiomyozyten sind in der Lage, kurze, vorübergehende Ischämiephasen zu tolerieren. Auch wenn diese Ischämie keinen Zelltod zur Folge hat, führt sie zu einer Schädigung der Myozyten. Im Hundeherz führt eine totale Okklusion der Koronararterie innerhalb einer Dauer von 15 min zu reversiblen Verletzung der Kardiomyozyten, eine Okklusion über einen längeren Zeitraum als 15 min jedoch zu irreversiblen Schäden am Myokard (Abb.8) (Kloner et al. 1974; Jennings et al. 1990). Eine Ischämiedauer von 15 min induziert viele Veränderungen in den nicht-kontraktierenden Myozyten, unter anderem einen Anstieg der „high-energy“ Phosphate und des Adenin-Nucleotidpools, eine Akkumulation von Laktat und H^+ und geringgradige intrazelluläre Ödeme. Zu diesem Zeitpunkt sind die Myozyten jedoch noch in der Lage, sich bei einer Wiederherstellung des normalen Blutstroms wieder zu erholen (Jennings et al. 1990).

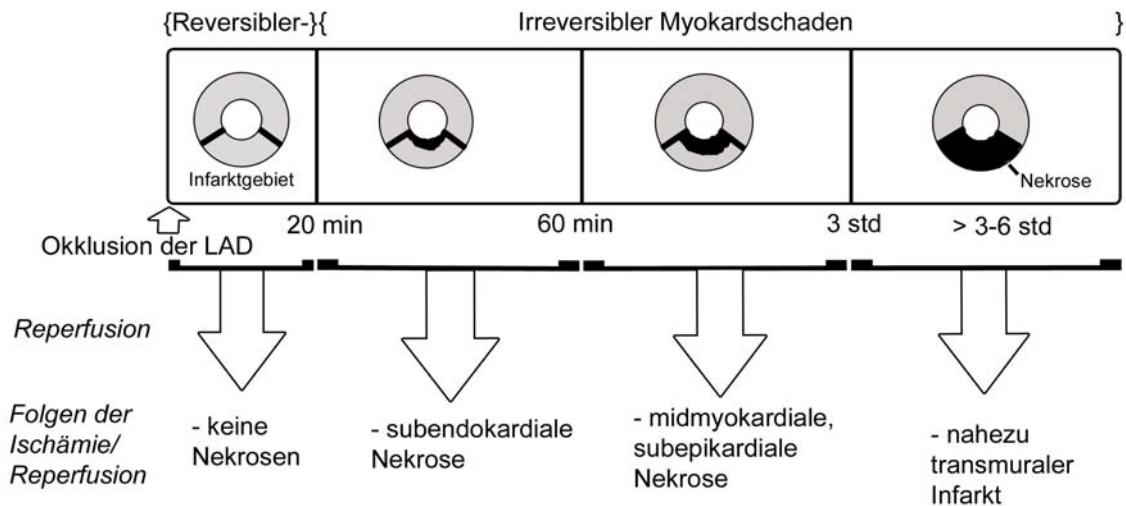


Abbildung 7 : Folgen von I/R bzw. permanenter Ligatur am Hundemodell mit Okklusion der proximalen Koronararterie

Bei dem I/R Modell mit Ischämiephasen < 20 min konnten keine Nekrosen des Myokards nachgewiesen werden. Bei Okklusionen > 20 min breitet sich die Nekrose beginnend am Subendokard auf das Subepikard aus. Bei Reperfusionen nach weniger als 3 std konnte noch teilweise vitales Myokard nachgewiesen werden, bei Reperfusionen nach > 3 h ist eine annähernd transmurale Nekrosezone zu erkennen. (Kloner and Jennings 2001)

2.3.2.1 Ischämie

Ein plötzlicher Verschluss einer der Hauptäste der Koronararterien führt beim Hundeherz zu physiologischen und metabolischen Veränderungen, die innerhalb von Sekunden auftreten. Unter anderem wird der aerobe mitochondriale Energiemetabolismus bereits nach acht Sekunden persistierendem reduziertem arteriellen Blutfluss auf anaerobe Glykolyse umgestellt (Jennings et al. 1990). Gleichzeitig hierzu vermindern sich die effektiven Kontraktionen der Kardiomyozyten und kommen teilweise ganz zum Erliegen. Das Myokard wird bei jeder Systole weiter gedehnt, das Membranpotential fällt ab und es erscheinen EKG-Veränderungen. Auf Grund der Tatsache, dass die Myozyten mehr Energie benötigen, als sie aus der anaeroben Glykolyse und den vorhandenen HEPs („high-energy Phosphates“) Reserven erhalten können, fällt das intrazelluläre ATP ab, da es zur Energiegewinnung zu ADP dephosphoryliert wird und ADP beginnt im Intrazellulärraum zu akkumulieren. 90% des Kreatininphosphat, eine der

SCHRIFTTUM

Hauptquellen für „high-energy Phosphates“, wird innerhalb der ersten 30 Sekunden verbraucht (Jennings et al. 1985). Durch die anaerobe Glykolyse entsteht Glucose-1-Phosphat, was wiederum zu Laktat verstoffwechselt wird. Das hier entstehende Laktat und dessen assoziiertes H^+ akkumulieren intrazellulär. So fällt innerhalb der ersten 10 Minuten der Ischämie der intrazelluläre pH-Wert auf 5,8-6 (Fleet et al. 1985) und die intrazellulär osmotisch aktiven Substrate wie Laktat, anorganisches Phosphat und Kreatinin steigen signifikant an (Jennings et al. 1986). Trotz dieses hyperosmotischen Zustandes steigt die Intrazellulärflüssigkeit nur geringfügig an, da extrazellulär durch die Ischämie bedingt nur sehr wenig Flüssigkeit verfügbar ist, weshalb die Zellschwellung zu diesem Zeitpunkt noch gering gehalten wird (Jennings et al. 1985).

Der Gewebsglykogenspiegel fällt ab und die Metaboliten der anaeroben Glykolyse wie Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, α -Glycerolphosphate und Laktat steigen an (Jennings et al. 1986). Der Adeninnucleotid-Pool wird vermindert, da das ADP auf Grund der gesteigerten Aktivität der ATPase vermehrt zu ADP abgebaut wird und akkumuliert, während die Rephosphorylierung zu ATP auf Grund der anaeroben Glykolyse, der Azidose und des akkumulierten Laktats nur sehr langsam vonstatten geht (Rovetto et al. 1975). Die „high-energy Phosphates“ des ADP werden durch die Adenylatkinase verbraucht, wodurch AMP entsteht und intrazellulär akkumuliert, wo es wiederum zu Adenosin abgebaut wird. Das Adenosin diffundiert in den Extrazellulärraum und wird dort weiter zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut, weshalb der intrazelluläre Adenosinnucleotid-Pool immer weiter schrumpft (Jennings and Steenbergen 1985).

Innerhalb weniger Minuten nach Einsetzen der Ischämie werden weitere Substanzen wie Bradykinin (Wall et al. 1994), Opioide (Schultz et al. 1995), Norepinephrin und Angiotensin (Martorana et al. 1990) ebenfalls in den Extrazellulärraum freigesetzt. Diese binden Rezeptoren auf den Myozyten und stimulieren hierdurch intrazelluläre Signalkaskaden.

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass im isolierten, perfundierten Herz die intrazellulären Ca^{+} -Ionen in der späten reversiblen Phase der Ischämie geringgradig ansteigen. Der intrazelluläre Anstieg der H^+ -Ionen führt über den Na^+/H^+ Austausch zu einem intrazellulären Anstieg von Na^+ . Dieser Anstieg induziert einen Austausch von intrazellulärem Na^+ gegen extrazelluläres Ca^{++} (Steenbergen et al. 1987). Im Gegensatz zu diesen Feststellungen konnte von Jennings et al in vivo nach einer

Ischämiephase von 15 Minuten und einer Reperfusion von 0,5, 3 und 20 Minuten kein Anstieg des Gesamtkalziums nachgewiesen werden (Jennings et al. 1985).

2.3.2.2 Reperfusion

Eine plötzliche Wiederherstellung des arteriellen Blutflusses in ein vormals ischämisches Gebiet hat zur Folge, dass der anaerobe Metabolismus wieder aufgehoben und geschädigte Myozyten repariert werden können (Jennings et al. 1990). Das Gewebe entwickelt zuerst eine reaktive Hyperämie mit einem Anstieg des Blutflusses um 400% bis 600%, welcher seinen Höhepunkt innerhalb der ersten 5 Minuten nach Reperfusion erreicht und innerhalb der nächsten 15-20 Minuten wieder auf ein normales Level abfällt. Hierdurch gelangt innerhalb der ersten 4-7 Minuten eine große Menge an Sauerstoffradikalen in das reperfundierte Gewebe, was die Schädigung von Zellorganellen bedingt und durch eine mitochondriale und gesamtzelluläre Schwellung zu erkennen ist (Jennings et al. 1985).

Innerhalb von ein bis zwei Minuten verschwinden die Veränderungen im EKG wieder und der Adeninnucleotidpool wird, wenn er nicht vollständig geleert war, durch die Rephosphorylierung von ADP und AMP bis auf 90% seiner ursprünglichen Menge wieder mit ATP angereichert. War er hingegen komplett geleert, wie es z.B. nach 15 Minuten Ischämie der Fall ist, so dauert es mehrere Stunden, bis dieser wieder aufgefüllt ist. Die Laktatkonzentration fällt auf ihr normales Level ab (Jennings et al. 1985), da Laktat in die periphere Zirkulation ausgeschieden oder zu CO_2 und H_2O oxidiert wird und folgend regeneriert sich der pH-Wert ebenfalls (Fleet et al. 1985).

Jedoch steigen die Kreatinphosphat- und Glucosekonzentration im Intrazellulärraum während dieser Phase deutlich an und sind noch zwei bis drei Stunden nach Eintreten der Reperfusion nachzuweisen (Jennings et al. 2001).

Bis auf die wenigen irreversibel geschädigten Mitochondrien verschwinden ultrastrukturelle Veränderungen innerhalb der Zelle in den ersten 5 Minuten und die Myofibrillen sind wieder in der Lage, sich zu kontrahieren (Jennings et al. 1985).

Während jeder Ischämiephase ist ein Anstieg von diversen Proteinen innerhalb der Myozyten zu erkennen. Zu diesen zählen die Superoxiddismutase (SOD), Hitzeschockproteine und die induzierbare Nitridoxidsynthetase (iNOS). Diese Proteine werden während der Ischämiephase synthetisiert und sind nach 24 Stunden

als Reaktion der Myozyten auf die ischämische Beeinträchtigung der Zelle vorhanden (Hoshida et al. 1993; Marber et al. 1993).

Allerdings wurde nachgewiesen, dass reperfundiertes Myokard, welches einmal eine Ischämiephase ohne irreversible Schäden überstanden hat, vom Zeitpunkt der Regeneration an auf zukünftige ischämische Insulte weniger empfindlich reagiert. Ebenso scheint das Myokard nach einer Reperfusion für eine gewisse Zeit „gelähmt“ (stunned) zu sein, da auf jede Ischämie eine reversible postischämische temporäre Dysfunktion der Muskelkontraktion folgt (Braunwald and Kloner 1982).

2.4 Myokardinfarktmodelle

Eine Vielzahl von verschiedenen Tiermodellen, vor allem Versuche an Ratten, hat während der letzten 50 Jahre dazu geführt, dass wir heute die Pathogenese des akuten Myokardinfarktes (AMI) besser verstehen (Wayman et al. 2003).

2.4.2 Tiermodelle des akuten Myokardinfarktes

Obwohl auch andere Tiere wie Maus, Hasen, Hund, Primaten etc. für Tiermodelle des akuten Myokardinfarktes verwendet wurden, überwiegen Versuche an der Ratte deutlich. Dies ist vor allem durch das einfache Handling, die wenig aufwendige Haltung und die geringen Kosten, die durch die Ratte verursacht werden, zu begründen (Wayman et al. 2003).

Die häufigste gebräuchliche Technik zur Auslösung eines Myokardinfarktes ist die operative Ligatur der A. coronaria sinistra. Dies wurde erstmals 1954 beschrieben. Zu diesem Zeitpunkt verwendete man eine komplette Ligatur der A. coronaria sinistra, eine Technik, die in den 80er Jahren histologisch und funktionell perfektioniert wurde (Johns and Olson 1954; Selye et al. 1960; Anversa et al. 1986). In den letzten Jahrzehnten wurde ein zweites Modell, die transiente Ligatur der A. coronaria sinistra entwickelt, um einen Reperfusionsschaden zu simulieren. Die vorübergehende Ligatur wird in den meisten Modellen für 30 Minuten belassen. Längere Ligaturzeiten von 60 oder 90 Minuten resultieren in größeren Infarktarealen und einer weitaus höheren Mortalität, weshalb diese Varianten in der Praxis weniger

häufig verwendet werden. Bei beiden Methoden werden ähnliche Operationstechniken, Narkoseregime und histologische Untersuchungen angewandt (Wayman et al. 2003; Chimenti et al. 2004).

Das Modell der transienten Ligatur ist das Modell der Wahl, um Therapien für Patienten mit akutem Myokardinfarkt einschließlich Reperfusionsschaden zu entwickeln. Die permanente Okklusion dagegen hilft uns, das kardiale Remodeling und die kardiovaskuläre Regeneration bei Patienten nachzuvollziehen, die nicht sofort nach Myokardinfarkt, sondern erst zeitverzögert vorgestellt werden (Wayman et al. 2003).

Die perioperative Mortalität nach Okklusion beträgt 10-50%, die nach Ischämie/Reperfusion ist weitaus geringer. Die Mortalitätsrate kann weiterhin durch ein vorsichtiges Handling der Tiere, eine möglichst geringe Manipulation des Herzens während der Operation, postoperative O₂ Zufuhr und eine Reexpansion der Lunge kurz vor Verschluss des Thorax vermindert werden (Ye et al. 1997; Kompa and Summers 2000). Klinische Symptome eines Herzversagens manifestieren sich vor allem 3-6 Wochen nach Okklusion der A. coronaria sinistra und bei einer Infarktgröße von über 40% (Pfeffer et al. 1979).

Ein wichtiger anatomischer Gesichtspunkt, der Ratte und Maus von anderen Tieren unterscheidet, ist die Blutzufuhr des interventrikulären Septums. Eine Okklusion der A. coronaria sinistra führt nur selten zu einem Infarkt der septalen Wand, da der das Septum versorgende Ast der Koronararterie sehr nah am Ursprung der A. coronaria sinistra abgeht und sich somit meist proximal der Ligatur befindet. Außerdem führt die Okklusion der A. coronaria sinistra nur sehr selten zu einer Infarzierung der Papillarmuskeln, wie es bei anderen Tieren der Fall sein kann (Spadaro et al. 1980).

2.4.3 Rattenmodell im Vergleich zum Mausmodell

Das Mausmodell des akuten Myokardinfarktes ist vor allem beliebt, weil auf eine relativ kostengünstige Art eine Vielzahl von Tierversuchen mit transgenen-, knock-out-Tieren oder Chimären durchgeführt werden kann. Ein Nachteil der Maus ist die Tatsache, dass ihre Organe um ein zehnfaches kleiner sind, als die der Ratte und deshalb sowohl chirurgische Mikroinstrumente, als auch optische Hilfen für die

Operationen notwendig sind. Morbidität und Mortalität sind bei Maus und Ratte annähernd gleich (Tarnavski et al. 2004).

Der bei der Maus entstehende Myokardinfarkt nach Ligatur der A. coronaria sinistra betrifft vor allem die anterio-apikale Wand des linken Ventrikels im Gegensatz zur Ratte, bei der vor allem die freie Wand des linken Ventrikels betroffen ist (Lutgens et al. 1999). Ähnlich wie bei der Ratte bewirkt die Ligatur mit Reperfusion bei der Maus Myokardnekrosen, die Margination von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNL) innerhalb der Venen und deren Infiltration in das ischämische Myokard über bis zu 24 Stunden nach Reperfusion (Michael et al. 1995). Allerdings zeigt die Maus eine ausgeprägtere transiente Immunantwort (Dewald et al. 2004).

Im Gegensatz zum Mausmodell hat das Rattenmodell des Myokardinfarktes eine geringere Prävalenz zur Herzruptur. Das kann damit zusammenhängen, dass die Ratte einen Mangel an MMP-1 (Matrix-Metalloproteinase-1) aufweist aber auch damit, dass die Ventrikelwand der Ratte eine größere Gesamtdicke aufweist, als die der Maus (Hirata et al. 1995).

Nach einer Okklusion der A. coronaria sinistra entwickeln sowohl die Ratte, als auch die Maus eine linksventrikuläre Dysfunktion und eine ähnlich hohe Expression von Chemokinen und Wachstumsfaktoren, inklusive IL-6 und TGF- β . TGF- α . Dagegen wird von der Ratte TNF- α sehr früh, sehr schnell und in kleinen Mengen exprimiert, die Maus dagegen weist eine intensive Expression sowohl innerhalb des Infarktes, als auch in den nicht infarzierten Gebieten auf (Deten et al. 2002).

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Zielvorstellung

Ziel dieser Arbeit ist, die intramyokardiale Transplantation von humanen endothelialen Progenitorzellen (EPCs) nach künstlich herbeigeführtem Myokardinfarkt am Modell der Nacktratte mit der intramyokardialen Transplantation von EPCs, die mit humanem Erythropoietin vermischt wurden zu vergleichen. Hierbei werden vor allem die myokardiale Funktion und die Infarktgröße post operationem, so wie die Neoangiogenese und die Infarktgröße post mortem in beiden Gruppen verglichen.

Die Ventrikelfunktion wird in vivo mittels Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht, indem die linksventrikuläre Auswurffraktion (LVEF), das linksventrikuläre enddiastolische (LVEDV), das linksventrikuläre endsystolische Kammervolumen (LVESV) und die regionale Wandbewegung bestimmt werden.

Die postmortale Auswertung der Vaskularisation erfolgt mittels Immunhistochemie, die Ausmessung der Infarktgröße mittels histologischer Verfahren.

In einem weiteren Versuch wurden zwei verschiedene Operationsmodelle verglichen. Hierbei handelt es sich jeweils um eine Thorakotomie mit Ligatur des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra (LAD). Bei dem ersten Modell wurde eine permanente Ligatur belassen, bei dem Zweiten handelt es sich um ein Reperusionsmodell mit Lösen der Ligatur nach 30 Minuten.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes vom 25. 05. 1998 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Zellbearbeitung

Alle Versuche im Zusammenhang mit der Zellgewinnung- und kultur werden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Die mit den Zellen agierende Person trägt Einmalhandschuhe und arbeitet unter einer Sterilbank mit Abzug („Hood“; Kojair

Biowizard, Kojair Oy Tech, Finnland), die nach jedem Arbeitsgang gründlich gereinigt und in regelmäßigen Abständen sterilisiert wird.

3.2.2 Zellgewinnung

Die für die Studie benötigten endothelialen Progenitorzellen (EPCs) werden aus Nabelschnurblut gewonnen. Das Nabelschnurblut wird von der geburtshilflichen Station des Klinikums rechts der Isar in München, mit Einverständnis der Patienten, für wissenschaftliche Arbeiten zur Verfügung gestellt.

Von dem aus der Nabelschnur gewonnenem Blut werden je 10 ml mit 10 ml Phosphatase Buffered Saline, PBS (GIBCO, Paisley, UK) gemischt. 15 ml Ficoll-Lösung (Ficoll-Hypaque TM Plus, Amersham Bioscience, UK) werden mit 15 ml dieses Gemisches überschichtet und dann für 30 min bei 1700 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Das aus Erythrozyten und Granulozyten bestehende Sediment wird verworfen, der durch die Ficoll-Lösung stabilisierte Überstand abgenommen und mit HF-Puffer gemischt und erneut zentrifugiert. Nun bleibt als Sediment ein Zellpellett, welches aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten (mononukleäre Zellen) besteht, übrig.

Zur Isolierung der CD34⁺ Zellen werden die Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten mit magnetischen „Kugeln“ (Magnetic Beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), die an CD34⁺ Zellen binden, gemischt und für 30 min im Kühlschrank inkubiert. Um nun die benötigten Zellen von den restlichen Leukozyten zu trennen, verwenden wir eine Magnetic Cell Sorting Säule (MACS Säule, Miltenyi Biotec), eine Säule, die sich innerhalb eines Magneten befindet und in die die Zellen eingebracht werden. Die mit Hilfe der Magnetic Beads markierten CD34⁺ Zellen adhären an der MACS Säule. Nachdem die Säule mehrmals mit HF-Puffer gespült wurde, wird diese aus dem Magneten entfernt und erneut mit 5 ml HF-Puffer gespült, um die sich noch in der Säule befindlichen CD34⁺ Zellen zu entfernen. Zum Erreichen einer höheren Zellmenge wird dieser Vorgang wiederholt.

Die Anzahl der lebenden Zellen wird in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Hierfür bringt man 10 µl Zellsuspension in die Zählkammer ein, zählt alle vier Quadrate aus, die ausgezählten Zellen werden durch vier dividiert und dieses Ergebnis mit 10 000 multipliziert. So erhält man die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Nun wird berechnet, in welcher Menge der Suspension sich 200 000 Zellen befinden und die entsprechende Menge zum Wachstum in eine mit dem Nährmedium EBM 2 (Endothelial Basal Medium, Cambrex, Walkersville, USA, bestehend aus 20 ml FBS, 4 ml hFGF-B, 1 ml GA-1000, 1 ml hEGF, 1 ml Ascorbinsäure, 1 ml R³-IGF, 1 ml VEGF, 1 ml Heparin und 0,4 ml Hydrocortison pro 1000 ml) gefüllte und mit Fibronectin (5 µg/cm², Cell Systems Biotechnologie, St. Katharinen) beschichtete T12,5 Flasche (Falcon Flask, BD Bioscience, Bedford, USA) eingebracht (Beschichtung der Flasche vorher über 30 Minuten bei 37°C). Das Nährmedium wird dreimal pro Woche gewechselt, wobei bei jedem Wechsel kontrolliert wird, ob die Zellen adhären, konfluieren oder Zellhaufen bilden. Konfluieren die Zellen ausreichend, so werden sie mit Hilfe von Trypsin aus der Flasche abgelöst und mit PBS gewaschen. Ab einer bestimmten Anzahl werden die Zellen gesplittet, d.h. auf mehrere mit Nährmedium gefüllte und mit Fibronectin beschichtete Flaschen aufgeteilt, in denen sie bis zur Transplantation verweilen.

Um die Reinheit der isolierten CD34⁺-Zellen zu bestimmen, wird ein Teil der Zellen für die Messung im FACS-Gerät mit CD34 PE (einem fluoreszierenden Antikörper gegen das Oberflächenprotein CD34, 100 µg/ml IgG Maus anti-human CD34-PE BD Bioscience, USA), 7AAD und CD45 FITC inkubiert, die Zellen dann mit PBS gewaschen und im FACS-Gerät gemessen. Die nicht vitalen Zellen markiert 7AAD, die Anzahl der vitalen CD34⁺ und CD45⁺ Zellen kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden.

Die expandierten Zellen besitzen einen endothelialen Phänotyp (Ott et al. 2005) und werden für die Experimente in Passage 4 und 5 verwendet.

3.2.3 Zusatz von EPO

Innerhalb des Versuches werden 50% der operierten Tieren reine EPCs intramyokardial transplantiert, 50% bekommen mit Erythropoietin (EPO) versetzte endotheliale Progenitorzellen injiziert.

Das verwendete EPO ist rekombinantes, humanes Erythropoietin mit 5000 IU/ml Epoetin beta (NeoRecormon® Multidose 50,000 IU, Roche, Mannheim).

Um die für diese Studie benötigte Verdünnung herzustellen werden 495 µl PBS mit 5 µl EPO gemischt (entspricht 50 IU/ml in der Endkonzentration), wobei dieses PBS-

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

EPO-Gemisch immer erst wenige Minuten vor der Transplantation hergestellt wird. Hiervon werden 150 µl abpipettiert und mit 1 bis $1,3 \times 10^6$ EPCs vermischt.

Diese 150µl EPO-Zell-PBS-Gemisch, was insgesamt 0,15x50 IU EPO entspricht, werden pro Rattenherz implantiert. Die zweite Gruppe erhält 150 µl PBS ohne Zusatz von Erythropoietin.

3.2.4 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere werden männliche Nacktratten (RNU, n=22) mit einem Alter von ca. 10 Wochen und einem Gewicht von 190-240g verwendet, gezüchtet bei der Firma Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Eingestallt werden die Ratten auf Grund des Transportstresses zur Akklimatisierung bereits 5-10 Tage vor Versuchsbeginn.

Nacktratten sind kongenital haar- und thymuslos, dadurch immunsupprimiert und reagieren somit nicht mit einer Immunantwort auf die Transplantation von humanen Zellen. Allerdings müssen auf Grund dieser Tatsache spezielle Haltungsbedingungen eingehalten werden, um die Tiere vor Kontamination zu schützen. Es werden jeweils zwei Tiere in einem Makrolonkäfig Typ III-erhöht (15 x 26,5 x 42 cm) gehalten. Dieser Käfig besitzt einen Filterhaubendeckel, so dass keine ungefilterte Luft in den Innenraum gelangen kann und befindet sich in einer individuell belüfteten Käfighalterung (IVC-Rack, individual ventilated cages), in der den Tieren gereinigter Sauerstoff zugeführt wird. Neben autoklaviertem Wasser steht ihnen bestrahltes Standardfutter für Ratten und Mäuse (Rattenpellets, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) ad libitum zur Verfügung.

Die Käfige enthalten autoklaviertes, staubarmes Einstreu und autoklaviertes Heu oder Zellstoff als Nistmaterial.

Zur Standardisierung des Versuches werden die Tiere bei einer Raumtemperatur von 20-23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten. Eine Beleuchtungsanlage stellt einen regelmäßigen zwölfstündigen hell-dunkel-Rhythmus sicher.

Durch regelmäßiges und standardisiertes Hygienemonitoring innerhalb des Zuchtbetriebes und mikrobiologische Qualitätskontrollen wird eine Keimfreiheit der Tiere garantiert.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Tierhaltungsräume werden durch ausgebildete Versuchstierpfleger betreut und es besteht eine personenlimitierte Zutrittskontrolle.

Die Tierhaltungs- und die Operationsräume befinden sich im Zentrum für präklinische Forschung der Technischen Universität München.

3.2.5 Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung

3.2.5.1 Versuch der Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von EPCs im akuten Myokardinfarkt

Innerhalb des ersten Versuches gibt es insgesamt zwei große Tiergruppen, die drei Tage [zwei Gruppen mit je 5 Tieren (n=10)] oder vier Wochen [zwei Gruppen mit je 12 Tieren (n=24)] überleben. In jeder dieser Gruppen befinden sich wiederum zwei Untergruppen. Einer dieser Untergruppen werden jeweils reine EPCs und der anderen mit EPO vermischte EPCs intramyokardial injiziert.

In beiden Gruppen wird eine laterale Thorakotomie mit Ligatur der LAD durchgeführt und das Ischämie-/Reperusionsmodell (I/R) verwendet.

Nach einer und nach vier Wochen werden mittels MRT die LVEF, das LVEDV, das LVESV und lokale Wandbewegungsstörungen bestimmt.

Post mortem werden immunhistologisch die Entzündungsreaktion (nach drei Tagen) und die Gefäßdichte im Randgebiet des Infarktes, so wie histologisch die Infarktgröße und der Expansionsindex (nach vier Wochen) ausgewertet.

3.2.5.2 Vergleich des Ischämie/Reperusionsmodelles mit dem Ligaturmodell

Im zweiten Versuch werden zwei Gruppen mit je 7 Tieren untersucht (n=14). In beiden Gruppen wird eine laterale Thorakotomie mit Ligatur der LAD durchgeführt. Bei der ersten Gruppe wird die Ligatur permanent belassen, bei der zweiten Gruppe wird die Ligatur nach einer Ischämiephase von 30 Minuten wieder gelöst. Keine der beiden Gruppen erhält eine Transplantation von Zellen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Alle Tiere werden nach vier Wochen mittels MRT (LVEF, LVESD; LVEDD und lokale Wandbewegungsstörung) untersucht und danach geopfert.

Post mortem werden histologisch die Infarktgröße, die Gefäßneubildung im Randgebiet des Infarktes, lokale Wandbewegungsstörungen und der Expansionsindex ausgewertet.

3.2.6 Versuchsdurchführung

3.2.6.1 Anästhesie, Narkoseüberwachung und Analgesie

Die Ratten werden mit einer intramuskulären (i.m.) Injektion in Narkose gelegt. Es wird eine Mischung aus Midazolam (0,15 mg/kg, Dormicum[®], Roche, Grenzach-



Abbildung 8 : Anesthesia Workstation

Wyhlen) , Medetomidin (2 mg/kg, Domitor[®], Pfizer, Karlsruhe) und Fentanyl (0,005 mg/kg, Ratiopharm, Ulm) (MMF) verwendet. Diese Mischung (=0,2 ml) wird zur Narkoseeinleitung intramuskulär (i.m.) injiziert, kurz vor Beginn der Operation wird die Narkose mit weiteren 0,15 ml i.m. bis zur chirurgischen Toleranz vertieft.

Nach der Narkoseeinleitung werden die Ratten intubiert und während der gesamten Operation mit reinem Sauerstoff, einem Druck 10 cm H₂O und 54 Atemzügen pro Minute beatmet (vgl. Abb.9:

Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen). Als Tubus wird ein Veneverweilkatheter (VENFLON PRO, 16GA, Fa.

Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) verwendet. Zusätzlich befinden sich die Tiere auf einer Wärmeplatte, deren Temperatur 40°C beträgt, um die Körpertemperatur konstant zu halten und einer Unterkühlung vorzubeugen. Die Ratten erhalten Augensalbe (Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Roche, Grenzach-Wyhlen), um ein Austrocknen der Kornea zu vermeiden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zur Narkoseüberwachung wird kontinuierlich rektal die innere Körpertemperatur bestimmt und die Tiere werden an ein Pulsoximeter (Nonin 8600V) angeschlossen, welches konstant Pulsfrequenz und Sauerstoffsättigung misst (Abb.10).



Abbildung 9 : Narkotisierte, intubierte Ratte prä OP; kontinuierliche Messung der Körpertemperatur und der Sauerstoffsättigung im peripheren Blut

Zur Analgesie werden erstmals kurz nach Verschluss des Thorax 0,1mg/kg Buprenorphin subcutan (s.c.) injiziert. Sobald die Tiere so wach sind, dass der Schluckreflex wieder vorhanden ist, bekommen sie zusätzlich 50 mg/kg Metamizol per os (p.o.) verabreicht. Die analgetische Behandlung wird über drei Tage, alle 8-12 Stunden wiederholt.

Zur Antagonisierung der Anästhesie wird eine Mischung aus Atipamezol (0,75 mg/kg Körpergewicht ANTISEDAN[®], Pfizer, Karlsruhe) und Flumazenil (0,2 mg/kg KG ANEXATE[®], Roche), im Folgenden als „AF“ bezeichnet, verwendet.

Da das zur Analgesie verwendete Buprenorphin bei Nagern eine Allotriophagie verursachen kann, werden die Käfige während der Zeit, in der die Tiere analgetisch behandelt werden nicht mit Einstreu, sondern ausschließlich mit sterilisiertem Heu ausgelegt.

3.2.6.2 Operationsmethode

Nach Intubation und Anschluss an das Beatmungsgerät (Anesthesia Workstation, Voelker GmbH, Kaltenkirchen) wird die Ratte in rechte Seitenlage verbracht und das Operationsfeld mit einem Skalpell rasiert, mit Alkohol entfettet, anschließend mit

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

jodhaltiger Lösung für 3 Minuten desinfiziert und mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt.

Der Hautschnitt wird ca. 2 cm caudal der Skapula von dorsal nach ventral, über eine Länge von ca. 3 cm durchgeführt (Abb.11) und die Rippen stumpf freipräpariert.

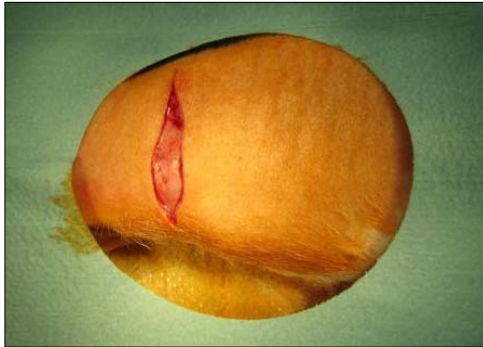


Abbildung 10 : Hautschnitt

Hierbei werden der M. cutaneus trunci, partiell der M. latissimus dorsi und der M. serratus ventralis thoracis mittels Spreizen der Metzenbaumschere getrennt. Der Thorax wird im dritten Interkostalraum durch ebenfalls stumpfes Durchstoßen der Mm. intercostales und anschließendes Spreizen der Metzenbaumschere eröffnet. Nach Positionierung eines Rippenspreizers wird das Perikard mit Hilfe einer

anatomischen Pinzette und eines Mikrodissektors eröffnet und möglichst komplett (soweit einsehbar) entfernt. So lässt sich der Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra (LAD) meist sehr gut darstellen und mit einem Vicrylfaden der Stärke 6-0 (Ethicon, Norderstedt) ligieren (Abb.12). Bei dem verwendeten Faden handelt es sich um eine Nadel-Faden-Kombination mit einer runden TF-1-Nadel. Bei der Ligatur wird darauf geachtet, dass das Myokard nicht zu oberflächlich, aber auch nicht zu tief durchstoßen wird. Bei zu oberflächlichem Stechen ist eine Verletzung der LAD oder anderer oberflächlicher Gefäße möglich, bei zu tiefem Stechen kann es zu einer Eröffnung des linken Ventrikels kommen. Um die spätere Lösung der Ligatur zu ermöglichen, wird ein ca. 1cm langes Fadenstück eines Prolenefadens der Stärke 0 (Ethicon, Norderstedt) medial unter die Ligatur gelegt. Die Ligatur besteht aus einem chirurgischen Knoten, auf welchen ein zweiter, einfacher Knoten aufgesetzt wird.



Abbildung 11 : Ligatur der LAD mit deutlicher Ischämie des Myokards

Der richtige Sitz der Ligatur wird durch die unmittelbare Entstehung eines ischämischen, also im Vergleich zum restlichen Myokard helleren Areal überprüft. Gleichzeitig steigt die Herzfrequenz der Tiere deutlich an. In seltenen Fällen kann es während der Ischämiephase zu Kammerflimmern kommen, welches makroskopisch

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

deutlich sichtbar ist. In diesem Fall werden lokal 50-100µl Amiodaron (Cordarex[®], Sanofi-Aventis, Frankfurt a.M.) auf das Herz geträufelt. Falls notwendig, kann eine manuelle Wiederherstellung des Herzrhythmus durch Herzmassage mit Hilfe eines sterilen Stabtupfers durchgeführt werden.

Nach Setzen der Ligatur, sowie Kontrolle der Herzfunktion wird der Rippenspreizer entfernt, die Öffnung im Thorax mit einem mit steriler Kochsalzlösung befeuchteten Tupfer bedeckt und eine Ischämiephase von 30 Minuten abgewartet. Anschließend wird der Rippenspreizer wieder eingesetzt, die Ligatur durch Durchtrennen des Vicrylfadens gelöst und das Fadenstück, welches dem Knoten untergelegt war, entnommen.

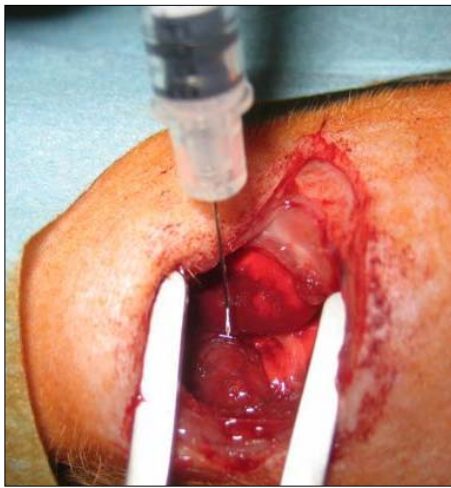


Abbildung 12 : intramyokardiale Injektion

Die jeweiligen Zellen werden mit einer Insulinspritze (U-40, Fa. Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) an fünf verschiedenen Punkten zirkulär in das Randgebiet der sichtbaren, da hell verfärbten, ischämischen Zone intramyocardial injiziert.

Der Verschluss des Thorax wird mit Einzelheften eines Vicrylfadens der Stärke 3-0 (Ethicon, Norderstedt) durchgeführt. Die Subkutis wird fortlaufend mit Vicryl 6-0 und die Haut mit U-Heften mit Vicry 3-0 verschlossen.

Nach Antagonisierung der Narkose werden die Tiere bei Einsetzen des Schluckreflexes extubiert.

Post operationem wird den Ratten bis zum Erlangen des vollen Bewusstseins noch reiner Sauerstoff über eine Atemmaske (hergestellt aus einer 20 ml Spritze) zugeleitet. Um eine Unterkühlung der Tiere vorzubeugen, wird den Tieren in den ersten sechs Stunden post operationem mittels eines Rotlichtstrahlers extern Wärme zugeführt.

3.2.6.3 MRT

Die kernspintomographischen Untersuchungen werden in der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der technischen Universität

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

München durchgeführt. Gemessen wird bei dem Versuch der intramyokardialen Injektion von EPCs gemischt mit EPO eine und vier Wochen post OP. Bei dem Vergleich des Ischämie/Reperusionsmodelles mit dem Ligaturmodell nur vier Wochen post OP.

Die Untersuchungen werden an einem klinischen 1,5 Tesla Philips Achieva MR Scanner durchgeführt, wobei jeweils ein dezidiertes kardiales Softwarepaket (R1.2.2) und ein klinisches Gradientensystem (30mT/m, 150 mT/m/ms) verwendet wird.

Für die Untersuchung werden die Ratten mit 0,2 ml MMF i.m. in Narkose gelegt und diese bis zum Ende der Messung alle 45 Minuten mit weiteren 0,1 ml MMF i.m. verlängert. Während der Untersuchung wird den Tieren über eine Atemmaske reiner Sauerstoff zugeführt. Um eine Auskühlung vorzubeugen, wird die Ratte zwischen zwei mit warmem Wasser gefüllte Einmalhandschuhe platziert. Weiterhin erhalten die Tiere während der Narkose



Abbildung 13 : Kernspintomographische Untersuchung einer Ratte

Augensalbe, um ein Austrocknen der Kornea zu verhindern.

Anschließend wird die Ratte in Brust-Bauch-Lage so auf eine Mikroskopiespule platziert, dass sich das Herz der Ratte im Zentrum der Spule befindet. Die verwendete Mikroskopiespule (Philips Medical System, Best, NL) hat einen Durchmesser von 47 mm.

3.2.6.3.1 EKG-Ableitung

Vor Beginn der Untersuchung müssen die Tiere an ein spezielles Kleintierelektrokardiogramm (EKG, 1025-MR, SA Instruments Inc., Stony Brook, NY) angeschlossen werden, da sonst keine kontinuierliche Überwachung der Tiere zu gewährleisten wäre und die kernspintomographische Untersuchung des Herzen nur EKG-getriggert möglich ist. Als Triggerimpuls verwendet man die R-Zacke des QRS-

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Komplexes. So dient bei einer Herzfrequenz (HF) unter 250/min jede, bei einer Herzfrequenz über 250/min jede zweite R-Zacke als Startpunkt für die nächste Messung. Die Bewegung des Herzens, die sonst Bewegungsartefakte erzeugen würde, kann somit abgefangen werden („Cardiac Gating“).

Für die EKG-Ableitung werden subkutane EKG-Sonden am ventralen Thorax auf Höhe des vierten Interkostalraumes angebracht und mit dem eigentlichen EKG verbunden, welches die Signale auf einen sich neben der Bedienungseinheit befindenden Laptop überträgt.

3.2.6.3.2 Untersuchung der Herzfunktion

Zunächst fertigen wir eine Übersichtsaufnahme („Localizer“) an, um die genaue Positionierung der Ratte selbst und die einzelnen anatomischen Strukturen darzustellen (Abb.15). Weiterhin dienen die Localizer später der genauen geometrischen Planung der weiteren Messsequenzen. Sie zeigen sowohl einen Zwei- als auch einen Vierkammerblick in der kurzen Achse.

Anders als beim Menschen wird bei Tieren im MRT die Untersuchung EKG-getriggert und in freier Atmung durchgeführt.

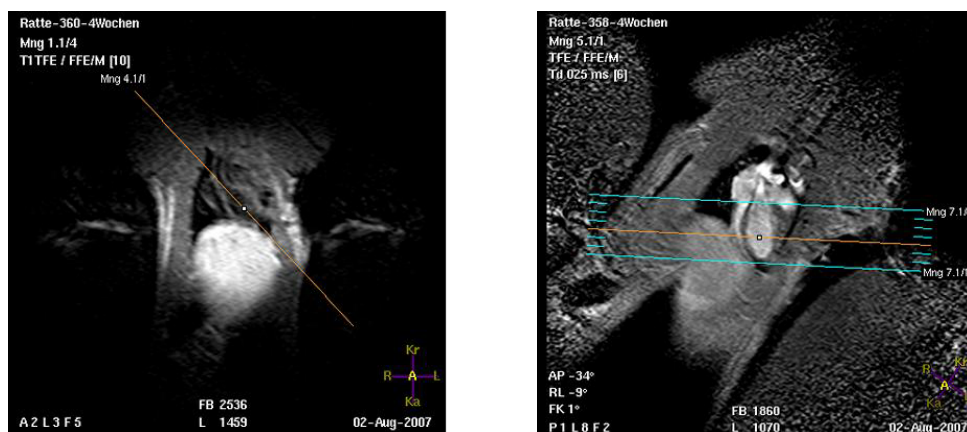


Abbildung 14 : Localizerequenzen zur Planung der Schnitfführung

Zur Funktionsdiagnostik des Herzens werden dynamische Gradientenecho, Turbo Field Echo (TFE) Sequenzen, verwendet. Hierbei wird das Herz in seiner Längs- und Kurzachse dargestellt und Zwei- und Vierkammerbilder angefertigt, die sowohl

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

einzel, als auch in direkter Abfolge (vergleichbar mit einem kurzen Film) betrachtet werden können.

Mit Hilfe der TFE-Sequenzen können die LVEF, das LVEDV, das LVESV und lokale Wandbewegungsstörungen qualitativ beurteilt werden.

Die Bildparameter beinhalten: TR/TE=14/4,5, Flipwinkel=30°, averages=1, FOV=35mm, Matrix=128.

Hierbei stellen TR die Repetitionszeit, die Zeit, nach der ein Impuls wiederholt wird und TE die Echozeit, die Bildaufnahmezeit dar. Der Flipwinkel ist der Auslenkwinkel, der bei schnellen Sequenzen statt eines 90° Impulses verwendet wird. Die Matrix ist eine Art zweidimensionalen Rasters, welches die Bildqualität bestimmt. Das FOV, Field of View, ist der betrachtete Bildausschnitt, der wiederum bei gegebener Matrixgröße die Pixelgröße bestimmt.

Die Messungen dauern je nach Anzahl der Schichten zwischen einer und zehn Minuten. Die Bilddaten haben eine Auflösung von $0,31 \times 0,31 \text{ mm}^2$ und eine Schichtdicke ΔZ von 2 mm.

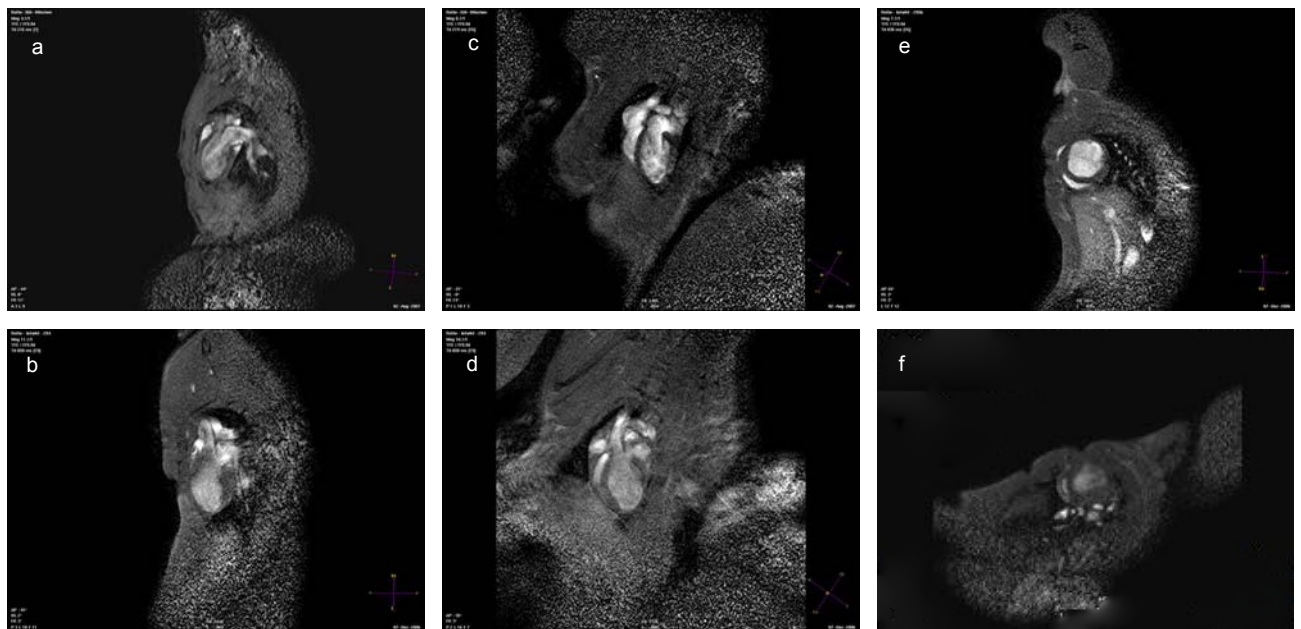


Abbildung 15 : TFE-Sequenzen zur Funktionsdiagnostik

a)+b): Zweikammerblick in der Längsachse

c)+d): Vierkammerblick in der Längsachse

e)+f) Kurzachsenschnitte

3.2.6.3.3 Auswertung der lokalen Wandbewegungsstörung

Um die regionale Wandbeweg, das LVEDV, das LVESV und die EF zu ermitteln, werden pro Herz ein Zwei- und ein Vierkammerblick, jeweils in der Längsachse geschnitten, ausgewertet. Die Auswertung wird mit dem Computerprogramm „Munich Heart“ (Dr. Stefan Nikkola der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der technischen Universität München, Germany) vorgenommen.

Zunächst werden in beiden Schnittebenen die maximale Systole und die maximale Diastole definiert, insgesamt werden pro Tier vier Bilder ausgemessen. In jedem Bild werden folgend das Endo- und das Epikard markiert und diese Markierung gespeichert. Aus den daraus erhaltenen Werten errechnet das Computerprogramm die Kontraktionseigenschaften des Myokards zwischen Diastole und Systole.

Die regionale Verkürzung in % der einzelnen Wandsegmente des linken Ventrikels zwischen Systole und Diastole wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{SystolischeWanddickeLV} - \text{DiastolischeWanddickeLV}}{\text{SystolischeWanddickeLV}} = \text{WandkontraktionLV}$$

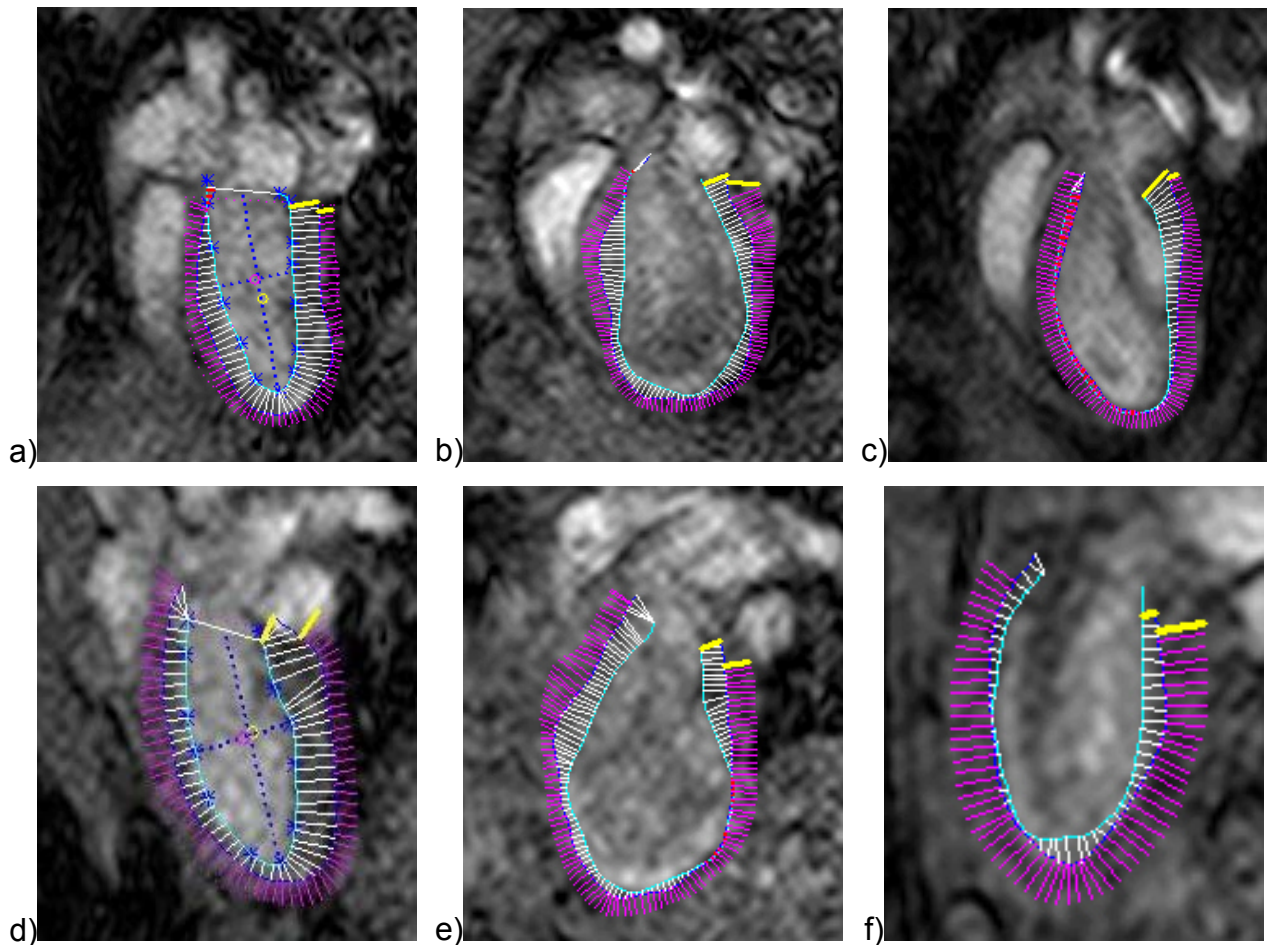


Abbildung 16 : Kennzeichnung der Diastole (blaue Linie) und Systole (türkise Linie) im Vier- (a,b,c) und Zweikammerblick (d,e,f) mit dem Computerprogramm „Munich Heart“

Zur Bezeichnung der einzelnen Wandabschnitte wird das 17-Segmentmodell, standardisiert von der American Heart Association, verwendet. In diesem Modell wird die Längsachse des linken Ventrikels in drei Drittel (apikal, mid-kavitär und basale) eingeteilt, wobei das apikale Segment 30%, das mid-kavitäre und das basale Segment jeweils 35% des linken Ventrikels umfasst.

In der Kurzachse erfolgt eine weitere Unterteilung. Das basale und mid-kavitäre Segment werden in sechs Einzelsegmente, die jeweils 60° betragen eingeteilt, das Apikale in vier mit jeweils 90°. Die Einzelsegmente werden sowohl numerisch, als auch durch ihre Lokalisation beschrieben (anterior, anterioseptal, inferioseptal, inferior, inferiolateral und anterolateral).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

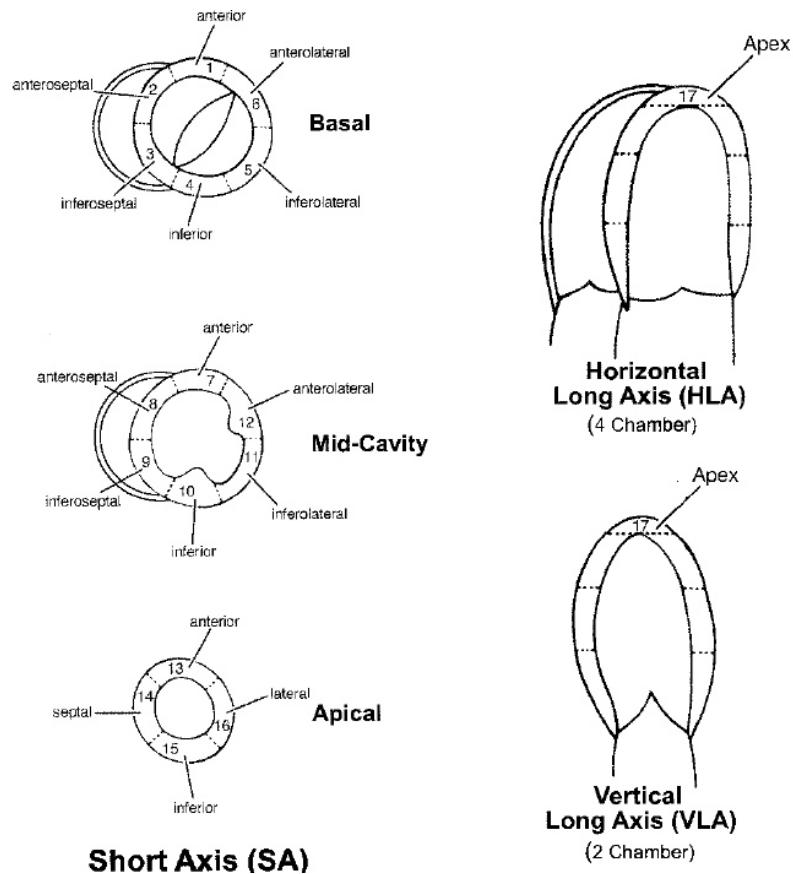


Abbildung 17 : 17-Segmentmodell der AHA

Die Ausmessung wird jeweils an der septalen Wand des linken Ventrikels begonnen und nach lateral fortgeführt, so dass man im Vierkammerblick mit dem Segment 2+3 beginnt, mit den Segmenten 8+9, 14, 17, 16, 11+12 fortfährt und das Segment 5+6 zuletzt bearbeitet. Im Zweikammerblick werden die Segmente in folgender Reihenfolge ausgemessen: 4, 10, 15, 17, 13, 7, 1.

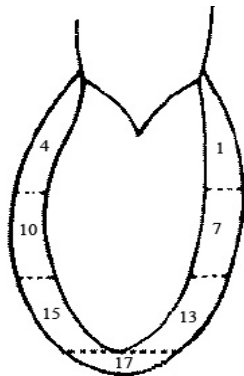


Abbildung 18 : Zweikammerblick des 17-Segmentmodells

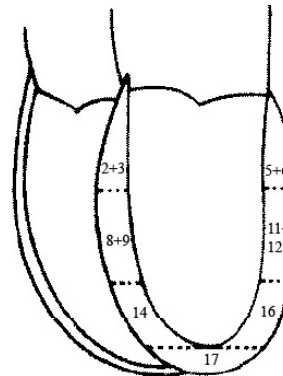


Abbildung 19 : Vierkammerblick des 17-Segmentmodells

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Als Ergebnisse erhält man die LVEF in %, das LVESV und LVEDV in ml und die regionale Wandbewegung in mm, was der Verkürzung der Ventrikelwand zwischen Systole und Diastole innerhalb der jeweiligen Segmente entspricht.

3.2.6.4 Euthanasie und Probengewinnung

Nach vier Wochen werden die Tiere geopfert und das Herz entnommen.

Hierbei werden die Ratten erneut mit 0,2 ml MMF i.m. narkotisiert und dann durch eine intravenöse (i.v.) Injektion von 300 mg/kg Pentobarbital (Narkoren[®], Merial, Rohrdorf) in die V. jugularis getötet. Nach einer sternalen Thorakotomie wird das Herz entnommen, wobei darauf geachtet wird, das Myokard so wenig wie möglich zu manipulieren.

Nach der Entfernung aller großen Gefäßstämme, des restlichen Perikards und der Herzohren werden die Hauptkammern und Vorhöfe mit 10 ml isotoner Kochsalzlösung gründlich durchspült, um alle Blutgerinnsel zu entfernen.

Nach der Spülung durchtrennt man das Herz mittels Skalpell im proximalen Drittel mit einem glatten Schnitt, der parallel zur Klappenebene geführt wird. Die Herzbasis wird für weitere Untersuchungen bei -80°C eingefroren, das distale Drittel in 6%igem Formalin für die histologische Aufarbeitung eingelegt.

3.2.7 Probenaufbereitung

3.2.7.1 Anfertigung histologischer Präparate

Die Herzen werden nach der Entnahme in 6%iger Formalinlösung fixiert. Nach 24 Stunden werden sie in Einbettkapseln eingelegt, für 12 Stunden entwässert und vorparaffiniert, um danach in flüssiges Paraffin (60°C) eingebettet zu werden. Zum Abkühlen und Erstarren werden die Paraffinblöcke auf eine Kühlplatte verbracht (TBS 88 Paraffin Embedding System, Thermal Unit, Cool Unit, Dispenser Unit, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland).

Von den vollständig erstarrten Paraffinblöcken werden folgend Mikroschnitte angefertigt. Dazu werden die eingebetteten Herzen erst ca. 20 Minuten auf einer –20°C kalten Platte gekühlt.

Die Mikroschnitte werden mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM 335 E, Fa.: MICROM International GmbH, Walldorf, Deutschland) angefertigt. Die Herzen werden komplett durchgeschnitten, was zwischen 16 und 24 Ebenen ergibt. Eine Ebene besteht immer aus 10 einzelnen, 2µm dicken Schnitten. Zwischen den Ebenen wird ein Abstand von 30 µm eingehalten.

Die fertigen Schnitte werden zunächst in einem 40°C warmen Wasserbad (Paraffin Streckbad, TF35, MEDITE Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) gestreckt und von dort aus auf Objektträger aufgezogen, um nachfolgend gefärbt zu werden.

Pro Ebene werden acht Schnitte für immunhistologische Färbungen auf SuperFrostPlus Objektträger (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig), und zwei Schnitte zur H.E. und Elastica van Giesson Färbung (E.v.G.) auf Super Frost Objektträger aufgezogen.

Zur Vermeidung der Abschwemmung der Schnitte von den SuperFrostPlus Objektträgern, werden diese vor dem Aufziehen mit einer PRITT-Kleber Mischung (Pritt®Bastelkleber, Fa Henkel, Düsseldorf, Deutschland 1:2 vermischt mit Poly-L-Lysine Lösung, Fa Sigma Diagnostics inc., St. Luis, USA) bestrichen.

3.2.7.2 Histologie

Die fertigen Präparate werden histologisch mit folgenden Färbungen gefärbt:

- Masson Trichrom Färbung
- Elastica van Giesson Färbung

3.2.7.2.1 Masson Trichrom

Die Masson Trichrom (MT) Färbung wird standardisiert mit einem Spezialfärbeprogramm eines Färbautomaten (Tissue Strainer, TST 30, Medite, Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) angefertigt.

Bei der Färbung nach MT färben sich die Kerne leuchtend rot, das Zytoplasma rosa, die Erythrozyten orangegelb und Bindegewebe blaugrün an.

3.2.7.2.2 Elastica van Gieson

Die Anfertigung der Elastica van Gieson (E.v.G.) Färbung wird standardisiert mit dem Färbautomat Tissue Strainer (TST 30, Medite, Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) durchgeführt.

Mit der E.v.G. Färbung färben sich die Zellkerne schwarz, das kollagene Bindegewebe rot und Muskulatur gelblich an. Somit eignet sich diese Färbung gut, um Narbengewebe, also das Infarktgebiet innerhalb des Herzmuskels, darzustellen.

3.2.7.3 Immunhistologie

Durch immunhistologische Verfahren kann man spezifische körpereigene Strukturen darstellen, gegen die Antikörper gebildet werden. Dadurch ist eine gezielte Anfärbung bestimmter Zellen möglich.

Es wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zum Einen wurde ein Antikörper gegen das Aktin der glatten Muskelzellen verwendet, um Arterien und Arteriolen zu markieren und zum Zweiten ein spezifischer Antikörper gegen das in

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Makrophagenzytoplasma exprimierte Molekül CD68, um die Entzündungsreaktion im Perinfarktgebiet darzustellen.

Es wurden für alle immunhistologischen Färbungen standardisierte Protokolle angewendet.

3.2.7.3.1 Aktin

Bei der Aktinfärbung wird ein gegen das α -smooth-muscle-Isotop des Aktins der glatten Muskelzellen gerichteter Antikörper, das Aktin mouse anti-human monoclonal (Alpha Smooth muscle, Clone 1A4, DakoCytomation, Carpinteria, USA) verwendet. Hiermit lassen sich glatte Muskelzellen der arteriellen Gefäße sehr gut (braunrot) darstellen. Herzmuskelzellen hingegen werden nicht angefärbt, sie stellen sich blassrosa dar.

Um die Färbung durchzuführen werden die Schnitte zunächst über 12-24 Stunden bei 56°C im Brutschrank gelagert, danach mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in Trispuffer (60,5g Trizma-Base, 700 ml Aqua dest., 2N HCL, 90 g NaCl) eingestellt.

Zunächst wird nun der Sekundärantikörper aufgetragen und über 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Auftragen des biotinylierten Sekundärantikörpers (Biotinylated anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins, LSAB2-Reagenz 1, DakoCytomation) inkubieren wir die Präparate für 25 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, um sie danach dreimal mit Trispuffer zu spülen. Hiernach folgt das Auftragen von LSAB -AP Reagenz 1 über 25 Minuten und erneutes dreimaliges Spülen mit Trispuffer, dann wird das LSAB -AP Reagenz 2 (Streptavidin conjugated to alkaline phosphatase, LSAB2-Reagenz 2, DakoCytomation), wieder über einen Zeitraum von 25 Minuten zugefügt und erneut dreimal mit Trispuffer gespült. Nach dem Auftragen des Farbstoffes Red Chromagen (Liquid permanent red chromagen, DakoCytomation) für 5-10 Minuten und dreimaligem Spülen mit Trispuffer wird zuletzt der Farbstoff Hämalaun zum Gegenfärben aufgebracht.

Vor dem Eindeckeln mit Eindeckmedium (Pertex®, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) werden die Präparate über die aufsteigende Alkoholreihe entwässert.

Die Aktinfärbung wird bei den Tieren des EPO-Versuches durchgeführt, die nach vier Wochen geopfert werden.

3.2.7.3.3 CD 68

Bei der CD68 mouse anti-rat Färbung (Monoclonal Mouse Anti-Rat CD68, Serotec, Düsseldorf, Deutschland) wird ein Antikörper gegen das bei Makrophagen stark exprimierte lysosomale Antigen CD68 verwendet. Hierdurch färben sich die Makrophagen leuchtend rot an.

Die fertigen Schnitte werden zunächst über Nacht bei 56°C in den Brutschrank verbracht und danach per Hand entparaffiniert. Folgend werden die Präparate in einem speziellem Trispuffer mit einem pH-Wert von 6,0 für 30 Minuten gekocht um das Gewebe zu demaskieren und das Antigen freizulegen. Nach zehnminütiger Abkühlzeit werden die Präparate mit Trispuffer (60,5g Trizma-Base, 700 ml Aqua dest., 2N HCL, 90 g NaCl) gespült, daraufhin mit Horse Normal Serum (Vectastain®, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland) für 40 Minuten geblockt und anschließend mit dem Primärantikörper mouse anti-rat CD68 für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Spülen mit Trispuffer wird auf die Präparate für 30 Minuten der biotinylierte Sekundärantikörper (IgG Maus-Antikörper, Vectastain®, Fa.Linaris, Wertheim, Deutschland) aufgetragen, danach dreimalig mit Trispuffer gespült und mit Vectastain-ABC-AP Reagentlösung (Reagent A und Reagent B in Antikörperdiluent verdünnt) für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wird erneut dreimal mit Trispuffer gespült und für 10 Minuten das Chromogen Fast Red (Dako Real™, Detection System, Glostrup, Dänemark). Zuletzt wird erneut dreimal mit Trispuffer gespült und für eine Minute mit Hämalaun gegengefärbt.

Vor dem Eindeckeln mit Eindeckmedium (Pertex®, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland) werden die Präparate mit warmem Wasser gebläut und mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Die CD68 Färbung wird bei den Tieren des Hauptversuches (Versuch mit intramyokardialer Injektion von EPO) durchgeführt, die nach drei Tagen geopfert werden.

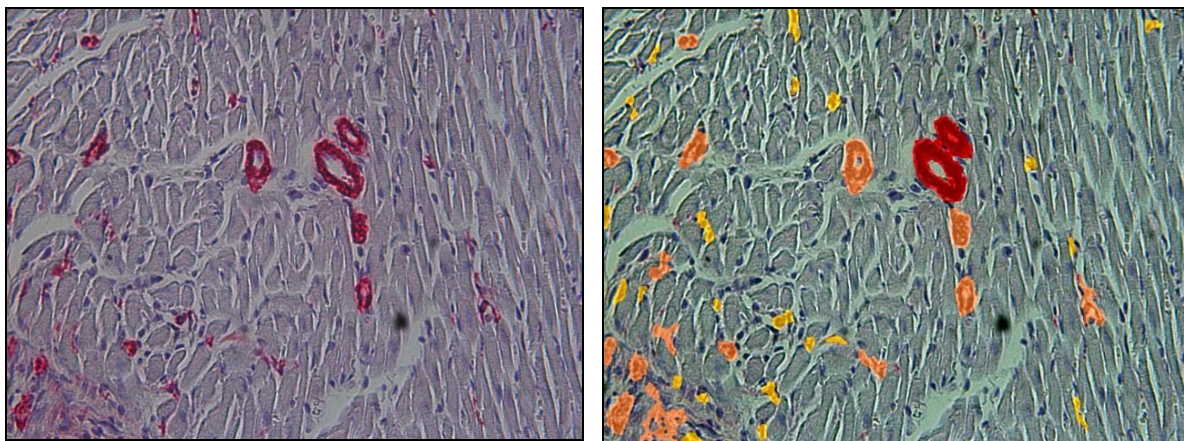
3.2.7.4 Ermittlung der Gefäßdichte

Zur Ermittlung der Gefäßdichte werden die mit der Aktinfärbung gefärbten Rattenherzen unter dem Mikroskop in zwanzigfacher Vergrößerung betrachtet, fotografiert und mit Hilfe des Computerprogrammes Axiovision 3.1 der Carl Zeiss Vision GmbH abgespeichert. Es werden von jedem Tier die drei Ebenen fotografiert, in denen der größte Infarkt zu erkennen ist. Pro Ebene werden je acht Gesichtsfelder im Perinfarktgebiet fotografiert.

Die eigentliche Gefäßdichte wird automatisch mit dem Computerprogramm „S.CORE online image analysis“ der S.CO GmbH, Garching, Deutschland ausgewertet.

Das Programm erkennt automatisch unterschiedlich große Gefäße und kennzeichnet diese. So werden kleine Gefäße gelb, mittelgroße Gefäße orange und große Gefäße rot angefärbt und anschließend sowohl die Gesamtzahl der unterschiedlich großen Gefäße pro Gesichtsfeld, als auch der prozentuale Anteil der Gefäße an der Gesamtfläche des jeweiligen Gesichtsfeldes ausgewertet (siehe Abbildung 20).

Da die Vaskulogenese im Rahmen der Regeneration einen längeren Zeitabschnitt in Anspruch nimmt, wurden lediglich die 4-Wochen-Tiere ausgewertet, da nach drei Tagen noch keine Gefäßneubildung zu erkennen ist.



a.)

b.)

Abbildung 20 : Aktinfärbung nach 4 Wochen

a.) Aktinfärbung nativ

b.) Aktinfärbung nach Bearbeitung mit „S.CORE online image analysis“

3.2.7.5 Ermittlung der Wanddicken und der Infarktgröße

Die Infarktgröße wird mit Hilfe des Computerprogrammes Sigma Scan Pro 5 Image Analysis (Version 5.0.0, Aspire Software International, Ashburn, USA) ausgewertet. Nachdem die mit der MT Färbung gefärbten Schnitte in einer zehnfachen Vergrößerung fotografiert und die Bilder auf den Computer übertragen sind, werden die Wanddicken und die Infarktgröße ausgemessen. Von jedem Tier werden jeweils die drei Schnitte in drei aufeinanderfolgenden Ebenen ausgemessen, in denen das Infarktgebiet zuvor mikroskopisch am deutlichsten zu erkennen war.

Zur Bestimmung der Wanddicken legt man das Herz auf dem Bildschirm so, dass der rechte Ventrikel nach oben zeigt (Abb.20). Die erste Messung erfolgt direkt durch die Mitte der infarzierten linken Wand, die Messlinien werden jeweils durch die komplette Wand, also vom Lumen des linken Ventrikels bis zum Perikard gelegt. Die zweite Messlinie wird am rechten Ende des Infarktes, die Dritte am linken Ende des Infarktes durch die komplette Wand gelegt. Mit der vierten und fünften Messung wird das Infarktgebiet in Viertel unterteilt und die sechste und letzte Linie befindet sich im interventrikulären Septum, zwischen linkem und rechtem Ventrikel.

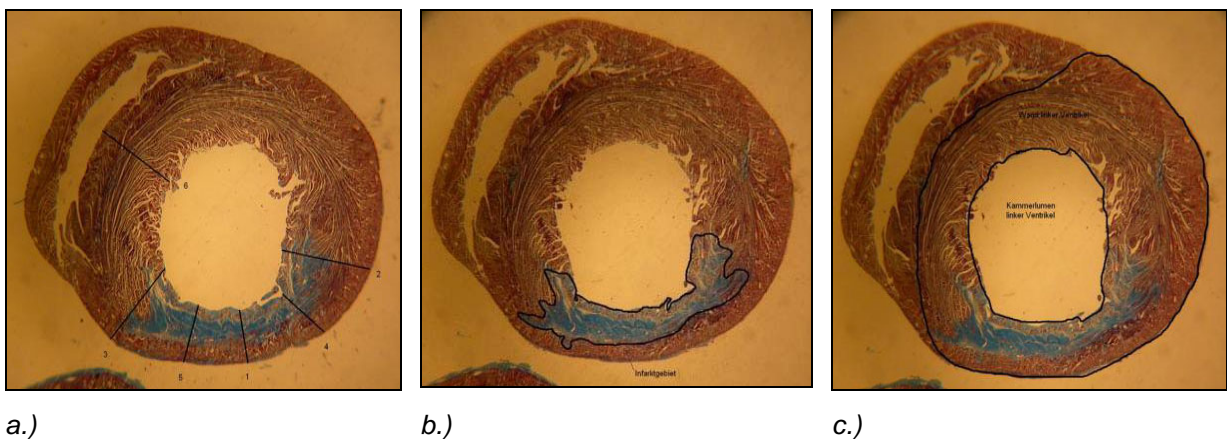


Abbildung 21: Messung der Wanddicken und der Infarktgröße

a.) Bestimmung der Wanddicken, b.) Infarktgebiet, c.) Kammerlumen und Wand des linken Ventrikels

Zur Bestimmung der Infarktgröße legt man das Herz auf dem Bildschirm wieder wie oben genannt. Das Prinzip besteht darin, einzelne Areale des Präparates mit Hilfe der Cursors der Computermouse einzukreisen, so zu markieren und letztendlich daraus die Infarktgröße zu bestimmen.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zuerst wird die komplette infarzierte Fläche (infarction area) umkreist und markiert. Als zweite Messung wird die gesamte linke Ventrikelwand (total LV area), inklusive Infarktgebiet, aber ohne das Kammerlumen und als dritte Messung das Kammerlumen (cavity area) des linken Ventrikels ausgemessen.

Aus diesen Werten wird nachfolgend der prozentuale Anteil der Infarktgröße und des Lumens (infarction area/total LV area; cavity area/total LV area) des linken Ventrikels ermittelt und daraus der Expansionsindex nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{cavity area}}{\text{total LV area}} \times \frac{\text{septal thickness}}{\text{scar thickness}} = \text{expansion index}$$

3.2.7.6 Ermittlung der Dichte der Entzündungszellen

Die Dichte der Entzündungszellen im Randgebiet des Infarktes wird ebenfalls mit dem Computerprogramm Sigma Scan Pro 5 Image Analysis (Version 5.0.0, Aspire Software International, Ashburn, USA) ausgewertet.

Die Auswertung erfolgt bei allen 3-Tages-Tieren, da nur hier eine akute Entzündung vorhanden ist. Um den prozentualen Anteil der Entzündungszellen zu ermitteln, werden pro Tier drei Gesichtsfelder bei zwanzigfacher Vergrößerung ausgewertet. Die Auswertung beginnt mit der manuellen Markierung aller deutlich rot gefärbten Zellen in einem vorher definierten Areal. Die Fläche dieser Zellen stellt die absolute Zahl der Entzündungszellen dar. Nachdem diese gemessen ist, wird die vorher definierte Gesamtfläche markiert und deren Grundfläche ausgemessen. Aus diesen beiden Werten errechnet sich der prozentuale Anteil der Entzündungszellen im Randgebiet des Infarktes nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gesamtfläche der CD68 + Zellen} \times 100}{\text{Definierte Fläche}} = \text{Makrophagen in \%}$$

3.2.7.7 Statistische Berechnung und Dokumentation

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Computerprogramm SPSS Version 10.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Mittelwertsunterschiede zwischen den einzelnen Untersuchungen werden anhand von t-Tests auf Signifikanz geprüft. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) $< 0,05$ beträgt, wird der geprüfte Wert als signifikant bewertet, ist $p < 0,01$, werden die Mittelwertsunterschiede als hochsignifikant beurteilt. Der Standardfehler (SEM) wird in Klammern hinter den Mittelwerten angegeben.

3.3 Ergebnisse des Versuches der Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von EPCs im akuten Myokardinfarkt

3.3.1 Ergebnisse in vivo

3.3.1.1 Entwicklung des Körpergewichtes

Obwohl sich die Versuchsratten auf Grund ihres Alters noch im Wachstum befinden, ist eine Gewichtsabnahme bzw.-stagnation innerhalb der ersten Woche post OP zu verzeichnen, ab der zweiten Woche post OP nimmt das Gewicht der Tiere wieder zu. Das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten, die kein EPO erhielten beträgt vor der Thorakotomie 214,08g ($\pm 6,58$), eine Woche post OP 209,83g ($\pm 6,06$), zwei Wochen post OP 230,52g ($\pm 5,71$) und 4 Wochen post OP 280,01g ($\pm 11,38$). Das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten die EPO erhielten beträgt prä OP 228,63g ($\pm 10,28$), eine Woche post OP 225,90g ($\pm 10,55$), zwei Wochen post OP 244,40g ($\pm 7,15$) und vier Wochen post OP 283,23g ($\pm 9,48$).

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

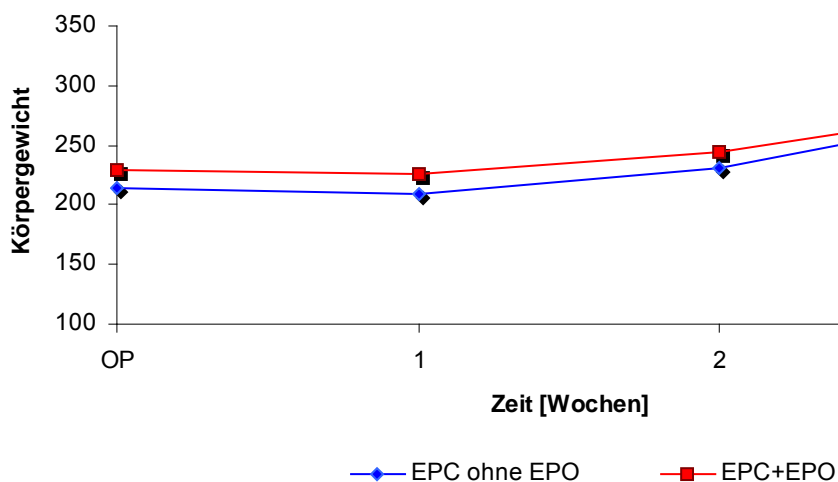


Diagramm 1 : Entwicklung des Körpergewichtes in g

Prä OP, 1, 2 und 4 Wo post OP

3.3.1.2 Mortalität

Von den insgesamt 41 operierten Tieren starben 7. Das entspricht einer Mortalität von 17,1%. Von den verstorbenen Tieren erhielten 5 Tiere mit EPO behandelte Zellen (12,2% der operierten, was 71,4% der verstorbenen Tiere entspricht), zwei Tiere (4,9% der gesamten operierten, was 28,6% der verstorbenen Tiere entspricht) verstarben, die reine EPCs injiziert bekamen. Fast alle Tiere verstarben innerhalb der ersten 6 Stunden post OP ohne das volle Bewusstsein wieder zu erlangen. Ein Tier, welches kein EPO verabreicht bekam, starb als einziges erst eine Woche post OP, als es für die MRT Untersuchung erneut in Narkose gelegt wurde. Allerdings zeigte dieses Tier bereits ein mittelgradig vermindertes Allgemeinbefinden vor der Narkose. Die verstorbenen Tieren wiesen alle keinen bzw. einen geringgradigen Blutverlust auf.

Die Auswertung der Ergebnisse bezieht sich auf die 34 überlebenden Tiere, die verstorbenen Tiere werden nicht mit in die Auswertung einbezogen.

	<u>EPCohne EPO</u>		<u>EPC+EPO</u>		<u>p</u>
	<u>Absolute</u> <u>Anzahl</u>	<u>%</u>	<u>Absolute</u> <u>Anzahl</u>	<u>%</u>	
<i>Mortalität</i>	2	4,9	5	12,2	0,18

Tabelle 3 : Mortalitätsrate

3.3.1.3 Intraoperative Komplikationen

Als intraoperative Komplikationen sind vor allem ein übermäßiger Blutverlust und Kammerflimmern aufgetreten.

33 (80,5%) der Tiere erlitten keinen oder einen geringgradigen Blutverlust, 5 (12,2 %) Tiere einen mittelgradigen Bei drei Tieren (7,3%) wurde beim Eröffnen des Thorax die A. thoracica interna verletzt, wodurch ein hochgradiger Blutverlust verursacht wurde.

Bei 2 der 41 operierten Tiere (4,9%) kam es intra operationem nach dem Durchstechen des Myokards zu Kammerflimmern. Eines dieser zwei Tiere erhielt darauf Zellen mit EPO, das andere reine EPCs.

Bei einem Tier (2,4%) wurde durch das Durchstechen des Myokards eine gering- bis mittelgradige Blutung ausgelöst; dieses Tier überlebte.

	<u>EPC+EPO</u>		<u>EPC ohne EPO</u>		<u>p</u>
	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	
<i>Verletzung A.thorac. int.</i>	-	-	1	2,4	0,353
<i>Kammerflimmern</i>	1	2,4	1	2,4	0,916
<i>Myokardblutung</i>	-	-	1	2,4	0,353
<i>Blutverlust kein/ ggr.</i>	14	34,1	18	43,9	0,535
<i>Blutverlust mgr.</i>	5	12,2	3	7,3	0,313
<i>Blutverlust hgr.</i>	1	2,4	1	2,4	0,916

Tabelle 4 : intraoperative Komplikationen

(%= prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der operierten Tiere)

3.3.1.4 Untersuchungen im MRT

Im Versuch über die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von EPCs im akuten Myokardinfarkt werden die MRT-Untersuchungen eine und vier Wochen nach der OP durchgeführt, innerhalb des Vergleiches des Ischämie/Reperfusionsmodelles mit dem Ligaturmodell lediglich eine MRT-Untersuchung vier Wochen post OP. Es werden jeweils die LVEF, das LVEDV, LVESV und die lokale Wandbewegung bestimmt.

3.3.1.4.1 linksventrikuläre Ejektionsfraktion

Die LVEF gesunder Ratten beträgt 56%. Innerhalb dieses Versuches beträgt die Gruppe der Tiere, die lediglich EPCs erhalten eine durchschnittliche LVEF von 56,85% ($\pm 2,16$) nach einer und von 62,28% ($\pm 3,38$) nach vier Wochen.

Die Tiere, bei denen EPO injiziert wird weisen nach einer Woche eine LVEF von 58,79% ($\pm 4,31$) und nach vier Wochen eine LVEF von 60,82% ($\pm 1,77$) auf.

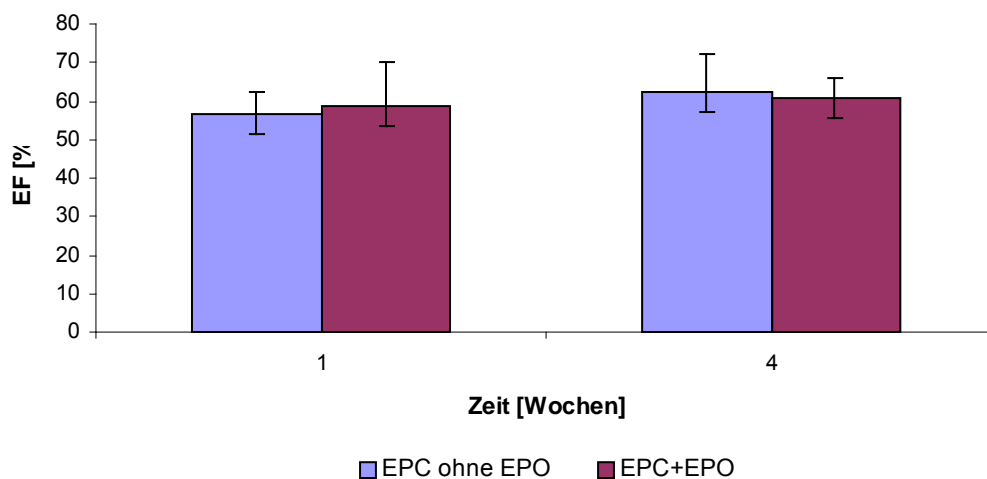


Diagramm 2 : LVEF in % im EPO-Versuch

3.3.1.4.2 Hämodynamik

Die Tiere, die lediglich EPCs erhielten haben nach einer Woche ein durchschnittliches LVEDV von 0,29 ml ($\pm 0,05$) und ein LVESV von 0,13 ml ($\pm 0,03$) und nach vier Wochen ein durchschnittliches LVEDV von 0,31 ml ($\pm 0,03$) und ein LVESV von 0,12 ml ($\pm 0,02$). Der Prozentuale Anteil des LVESV am LVEDV beträgt nach einer Woche 43,15% ($\pm 0,02$), nach vier Wochen 38,05% ($\pm 1,87$).

Die Tiere, denen EPO und EPCs injiziert wurden haben nach einer Woche ein durchschnittliches LVEDV von 0,32 ml ($\pm 0,02$) und ein LVESV von 0,14 ml ($\pm 0,02$) und nach vier Wochen ein durchschnittliches LVEDV von 0,38 ml ($\pm 0,02$) und ein LVESV von 0,14 ml ($\pm 0,02$). Der Prozentuale Anteil des LVESV am LVEDV beträgt nach einer Woche 44,06% ($\pm 3,84$), nach vier Wochen 36,36% ($\pm 2,36$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

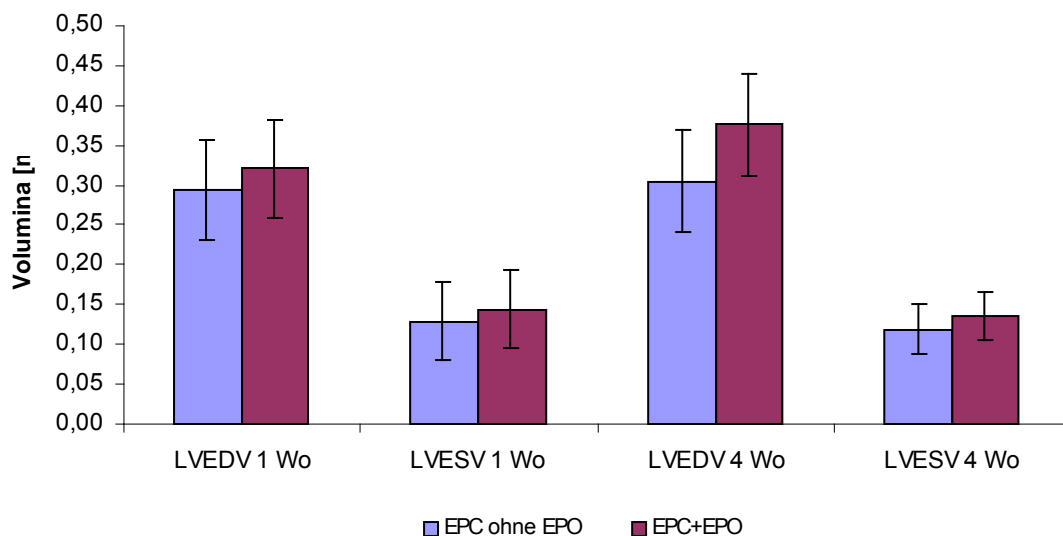


Diagramm 3: : Linkshertikuläre eddiastolische und endsystolische Volumina in ml nach einer und vier Wochen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	<u>EPC ohne EPO</u>	<u>SEM</u>	<u>EPC+EPO</u>	<u>SEM</u>	<u>p</u>
LV EDV 1 Wo	0,29	0,05	0,32	0,02	0,62
LV ESV 1 Wo	0,13	0,03	0,14	0,02	0,62
LV EDV 4 Wo	0,31	0,03	0,38	0,02	0,08
LV ESV 4 Wo	0,12	0,02	0,14	0,02	0,46
% 1 Wo	43,14	0,02	44,06	3,84	0,8
% 4 Wo	38,05	1,87	36,38	2,36	0,7

Tabelle 5 : Linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumina in ml 1 und 4 Wochen post OP (SEM: Standardfehler, %= prozentualer Anteil des LVESV am LVEDV)

3.3.1.4.3 Regionale Wandbewegung

Die regionale Wandbewegung wird mit dem MRT ermittelt. Zur Darstellung der einzelnen Segmente verwendet man einen Zwei- und einen Vierkammerblick.

Es bestehen signifikanten Unterschiede bei der Kontraktion einzelner Segmente zwischen den Tieren, die EPCs und EPO und den Tieren, die lediglich EPCs erhielten.

So zeigen die Tiere, die EPO erhielten eine signifikant bessere Kontraktion der Vorderwandsegmente. Die Segmente der Vorderwand stellen im Zweikammerblick das anteroapikale (13), das anterior midkavitäre (7) und das anterior basale Segment dar. Im Vierkammerblick sind dies die anteriorlateral und Inferolateral midkavitäre und das Anterolateral und Inferolateral basale (5+6) (siehe Diagramm 4 und 5 bzw. Tabelle 7 und 8).

Die Tiere, die kein EPO erhielten weisen dagegen eine signifikant bessere ($p < 0,05$) Kontraktion der Hinterwand des linken Ventrikels auf. Diese Hinterwandsegmente im Zweikammerblick sind das inferobasale (4) und das inferior-midkavitäre (10) Segment, im Vierkammerblick sind dies das Anterio- und Inferioseptale (2+3) und das Anterioseptale und Midkavitäre (8+9).

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

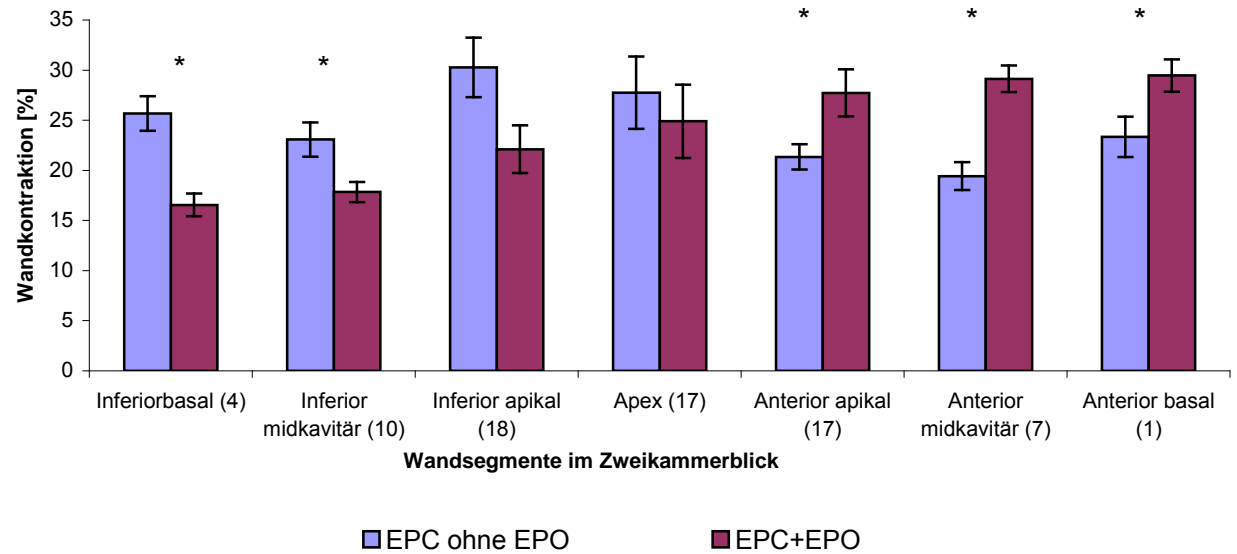


Diagramm 4 : Regionale Wandbewegung(in %) der Wandsegmente 4, 10, 18, 17, 13, 7 und 1 im Zweikammerblick
(*: $p < 0,05$)

Die regionale Verkürzung in % der einzelnen Wandsegmente des linken Ventrikels zwischen Systole und Diastole wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Systolische Wanddicke LV} - \text{Diastolische Wanddicke LV}}{\text{Systolische Wanddicke LV}} = \text{Wandkontraktion LV} [\%]$$

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die so errechneten Werte sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

<u>Zweikammerblick (Wandkontraktion in %)</u>			
	<u>EPC+EPO</u>	<u>EPC</u>	<u>p</u>
<u>4</u>	25,66	16,55	0,0003
SEM	1,72	1,14	
<u>10</u>	23,08	17,84	0,02
SEM	1,71	1,02	
<u>18</u>	30,26	22,10	0,05
SEM	2,97	2,38	
<u>17</u>	27,75	24,90	0,59
SEM	3,61	3,66	
<u>13</u>	21,34	27,73	0,03
SEM	1,26	2,35	
<u>7</u>	19,43	29,14	0,0001
SEM	1,38	1,32	
<u>1</u>	23,35	29,46	0,03
SEM	2,02	1,62	

Tabelle 6 : Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 4, 10, 15, 17, 13, 7 und 1 im Zweikammerblick (in %)

(SEM=Standardfehler)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Im Folgenden (Diagramm 5) wird die regionale Wandbewegung im Vierkammerblick graphisch dargestellt:

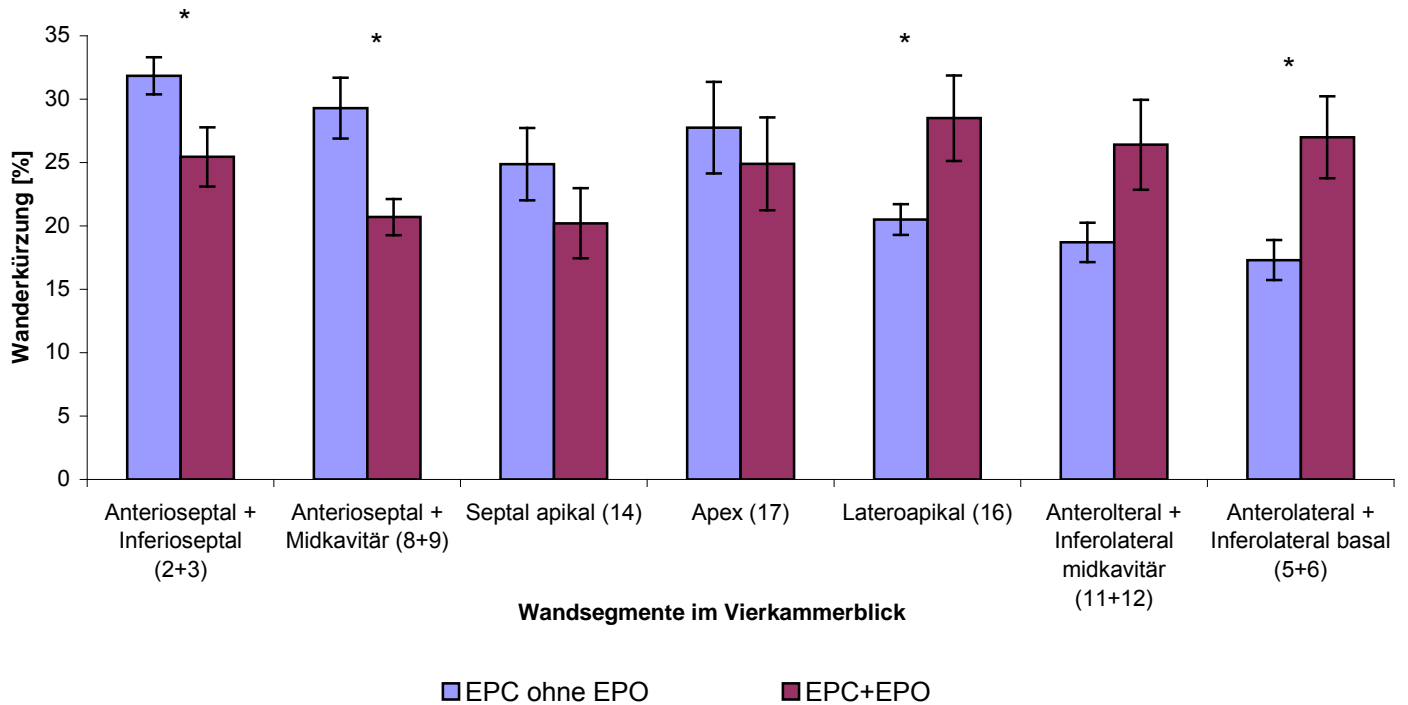


Diagramm 5 : regionale Wandbewegung in% im Vierkammerblick (*: $p < 0,05$)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die absoluten Werte der Kontraktionseigenschaften im Vierkammerblick sind in Tabelle 7 zusammengefasst:

<u>Vierkammerblick (Wandkontraktion in%)</u>			
	<u>EPC+EPO</u>	<u>EPC</u>	<u>p</u>
<u>2+3</u>	31,84	25,45	0,03
<i>SEM</i>	1,47	2,33	
<u>8+9</u>	29,29	20,69	0,01
<i>SEM</i>	2,40	1,43	
<u>14</u>	24,87	20,21	0,23
<i>SEM</i>	2,85	2,77	
<u>17</u>	27,75	24,90	0,61
<i>SEM</i>	3,61	3,66	
<u>16</u>	20,50	28,5	0,04
<i>SEM</i>	1,21	3,37	
<u>11+12</u>	18,70	26,41	0,06
<i>SEM</i>	1,55	3,55	
<u>5+6</u>	17,31	26,99	0,01
<i>SEM</i>	1,58	3,24	

**Tabelle 7 : Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 2+3, 8+9, 14, 17, 16, 11+12 und 5+6
Im Vierkammerblick (in % Verkürzung der Segemnete nach vier Wochen)**

(SEM=Standardfehler)

3.3.2 Ergebnisse ex vivo

3.3.2.1 Histologische Ergebnisse

3.3.2.1.1 Infarktgröße

Mit Hilfe der in 3.2.5.2.1 beschriebenen Masson Trichrom Färbung wird bei allen Tieren histologisch die absolute Infarktgröße ausgemessen und daraus die relative Infarktgröße als prozentualen Anteil des linken Ventrikels errechnet.

3-Tages-Tiere:

Die Tiere, die nur EPCs erhalten und drei Tage nach der Operation geopfert werden, zeigen eine relative Infarktgröße von 50,24% ($\pm 8,87$), die, die zusätzlich EPO erhalten eine von 51,19% ($\pm 6,14$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=0,96$).

4-Wochen-Tiere:

Bei den Ratten, die lediglich EPCs erhielten beträgt das arithmetische Mittel der relativen Infarktgröße nach vier Wochen 18,59% ($\pm 2,32$), bei den Tieren mit EPO 24,77% ($\pm 3,65$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p=0,15$).

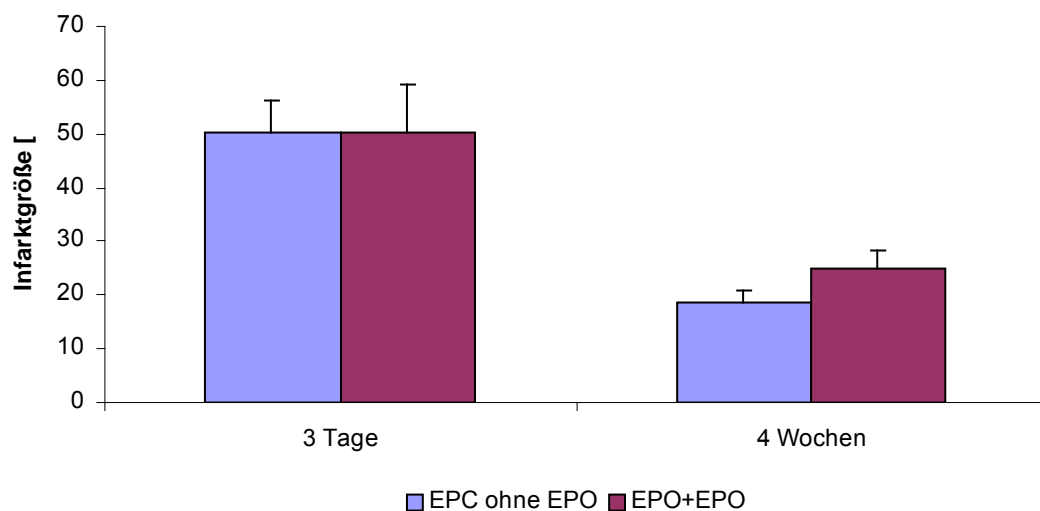


Diagramm 6 : Infarktgröße in % nach drei Tagen und vier Wochen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der Masson Trichrom Färbung stellt sich das infarzierte Areal blauviolett, das nicht ischämische Myokard dagegen rot dar (vgl. Abbildung 22). Die Intensität der Farben kann hierbei variieren.

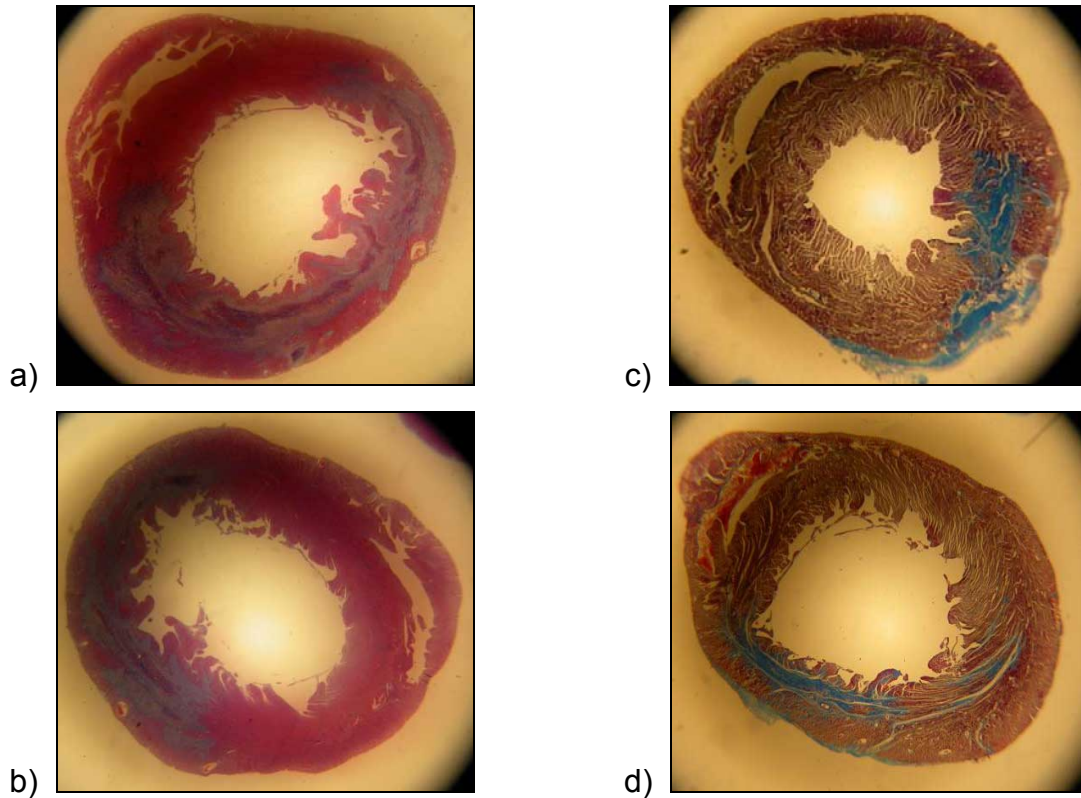


Abbildung 22 : Darstellung der Infarktgröße in der Masson Trichrom-Färbung

- nach drei Tagen [a) EPCs+EPO und b) EPCs ohne EPO] und
- nach vier Wochen [c) EPCs+EPO+d) EPCs ohne EPO]

3.3.2.1.2 Expansionsindex

Der Expansionsindex wird, wie in 3.2.5.5 beschrieben, aus dem Verhältnis der Größe der linken Ventrikelwand zum linken Ventrikellumen und aus den durchschnittlichen Wanddicken des infarzierten Gebietes berechnet.

3-Tages-Tiere:

Die Tiere, die EPCs mit EPO vermischt erhielten, haben einen durchschnittlichen Expansionsindex von 30% (± 9), die, die reine EPCs erhielten einen von 31% (± 8). Es liegt kein signifikanter Unterschied vor ($p > 0,05$).

4-Wochen-Tiere:

Die Tiere, die EPCs mit EPO vermischt erhielten, haben einen durchschnittlichen Expansionsindex von 44% (± 8), die, die reine EPCs erhielten einen von 39% (± 7). Es ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen ($p > 0,05$).

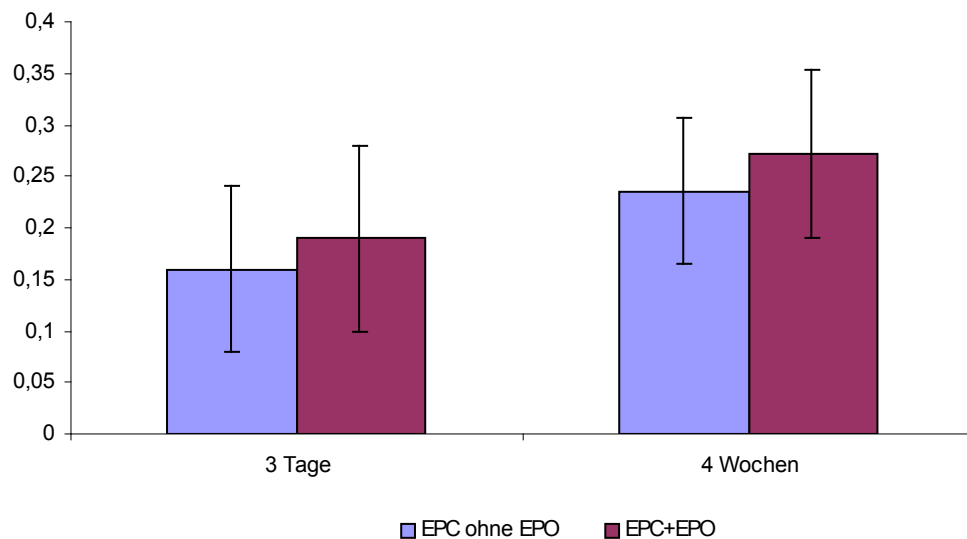


Diagramm 7 : Expansionsindex

3.3.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

3.3.2.2.1 Aktinfärbung

Zur Ermittlung der Gefäßdichte wurden die Präparate der 4-Wochen-Tiere, wie in 3.2.5.3.1 beschrieben, mit Hilfe eines Antikörpers gegen das α -smooth-muscle-Isotop des Aktins der glatten Muskelzellen angefärbt (Abb.23) und folgend (vgl. 3.2.5.4) ausgewertet.

Das Computerprogramm „S.CORE online image analysis“ erkennt automatisch unterschiedlich große Gefäße und kennzeichnet diese. So werden kleine Gefäße gelb, mittelgroße Gefäße orange und große Gefäße rot angefärbt und anschließend sowohl die Gesamtzahl der unterschiedlich großen Gefäße pro Gesichtsfeld, als auch der prozentuale Anteil der Gefäße an der Gesamtfläche des jeweiligen Gesichtsfeldes ausgewertet (siehe Abbildung 23).

Es ergab sich bei den 4-Wochen-Tieren, denen reine EPCs injiziert wurden ein prozentualer Anteil von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet von 3,6% ($\pm 0,35$). In absoluten Zahlen ausgedrückt ergibt sich eine Anzahl von 25,05 ($\pm 2,21$) Gefäßen pro Gesichtsfeld. Diese setzt sich zusammen aus 17,14 ($\pm 0,74$) kleinen, 7,11 ($\pm 0,74$) mittelgroßen und 0,8 ($\pm 0,16$) großen Gefäßen.

Bei den Ratten, denen EPCs+EPO injiziert wurde, konnte eine prozentuale Anzahl von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet von 6,46% ($\pm 1,11$) festgestellt werden. In absoluten Zahlen ausgedrückt ergibt sich eine Anzahl von 28,48 ($\pm 3,37$) Gefäßen. Diese setzt sich zusammen aus 16,81 ($\pm 1,83$) kleinen, 9,69 ($\pm 1,5$) mittelgroßen und 1,98 ($\pm 0,46$) großen Gefäßen.

Somit zeigen die Tiere, denen EPCs+EPO injiziert wurden einen signifikant höheren Anteil an großen Gefäßen ($p=0,01$) und einen signifikant höheren prozentualen Anteil der vaskulären Strukturen ($p=0,01$) im Bezug auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen im Randgebiet des Infarktes.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

	<u>EPC</u>	<u>SEM</u>	<u>EPC+EPO</u>	<u>SEM</u>	<u>p</u>
<u>gr</u>	0,8	0,16	1,98	0,46	0,01
<u>mt</u>	7,11	0,74	9,69	1,50	0,11
<u>kl</u>	17,14	0,74	16,81	1,83	0,89
<u>Σ</u>	25,05	2,21	28,48	3,37	0,38
<u>%</u>	3,6	0,35	6,46	1,11	0,01

Tabelle 8 : : Auswertung der Gefäßdichte mit Hilfe der Aktinfärbung im Hauptversuch

(gr: große Gefäße, mt: mittelgroße Gefäße, kl: kleine Gefäße, Σ: Gesamtsumme der vaskulären Strukturen- jeweils gezählt im Randgebiet des Infarktes, %: prozentualer Anteil der vaskulären Strukturen im Bezug auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen innerhalb eines Gesichtsfeldes im Randgebiet; SEM: Standardfehler)

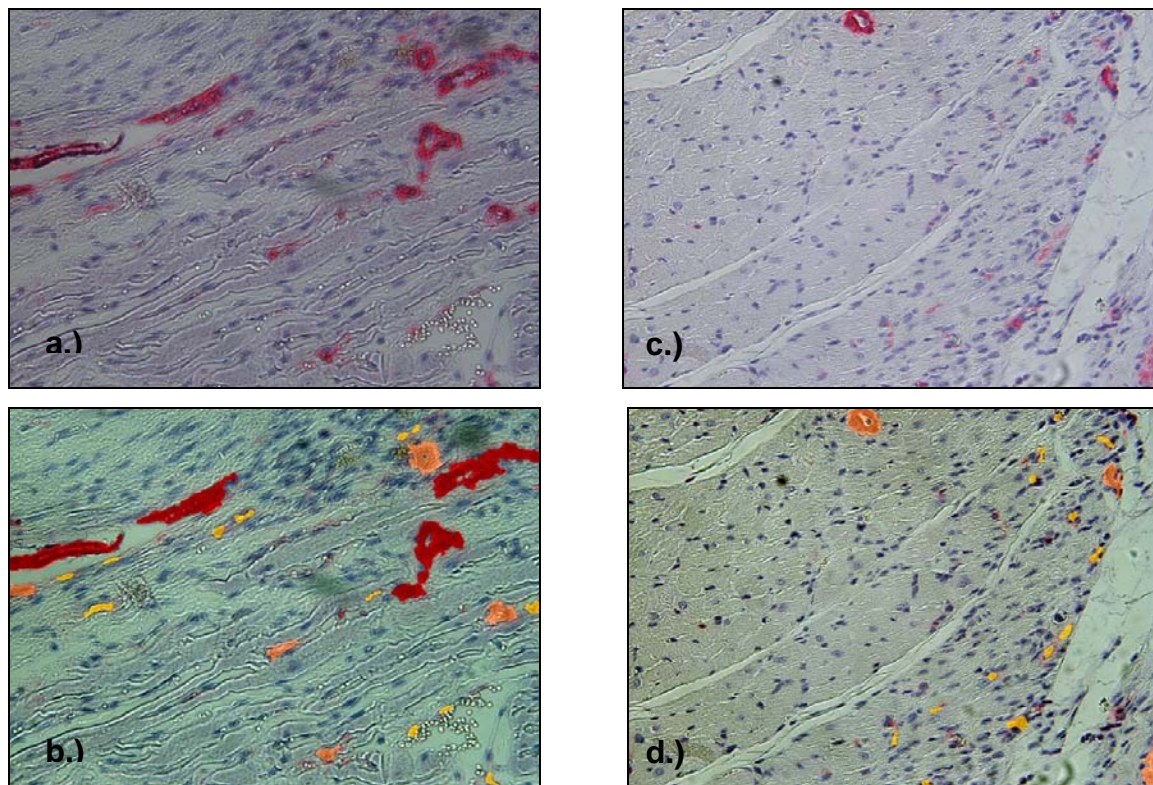


Abbildung 23 : Aktinfärbung nach vier Wochen; die Gefäße färben sich rot an; nativ (a und c) und mit farblich gekennzeichneten Gefäßen (b und d)

a) + b) Tier mt EPCs+EPO
c) + d) Tier mit EPCs ohne EPO
(rot=große Gefäße; orange=mittelgroße Gefäße; gelb=kleine Gefäße)

3.3.2.2.2 CD 68-Färbung

Zur Darstellung der Makrophagen innerhalb der akuten Entzündungsreaktion nach drei Tagen werden die Präparate, wie in 3.2.5.3.2 beschrieben, mit einem markierten Antikörper gegen das auf Makrophagen stark exprimierte Adhäsionsmolekül CD68 angefärbt (siehe Abbildung 24) und wie in 3.2.5.6 beschrieben ausgewertet.

Bei den Tieren, denen lediglich EPCs injiziert wurden, konnte ein prozentualer Anteil der Entzündungszellen an den Gesamtzellen von 38,65% ($\pm 0,62$) gemessen werden. Die Tiere, die EPCs vermischt mit EPO erhielten, wiesen einen Anteil von 66,23% ($\pm 4,76$) auf.

Somit ergab sich ein signifikant höherer prozentualer Anteil ($p=0,001$) von CD 68+ Zellen bei den Tieren, die EPCs und EPO erhielten.

	<u>EPC</u>	<u>SEM</u>	<u>EPC+EPO</u>	<u>SEM</u>	<u>p</u>
CD68+ Zellen in %	38,65	0,62	66,23	4,76	0,001

Tabelle 9 : prozentualer Anteil der CD68+ Zellen an den Gesamtzellen im Randgebiet des Infarktes bei den 3-Tages-Tieren

(SEM: Standardfehler)

Dieser signifikant höhere Anteil an CD 68+ Zellen ist auch makroskopisch deutlich zu erkennen. So fällt in den Bildern a.) und b.) der Abbildung 24 eine deutliche Infiltration von Entzündungszellen auf. Diese beiden Bilder sind, im Gegensatz zu c.) und d.) wesentlich intensiver rot angefärbt.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

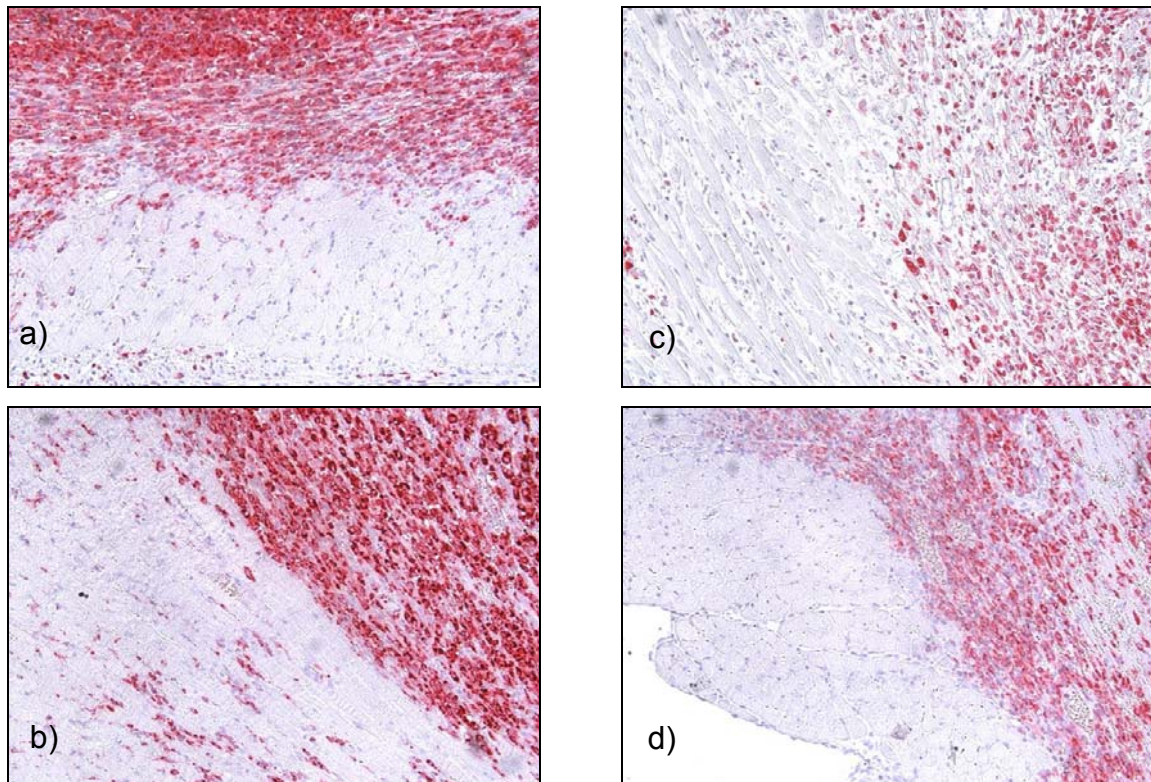


Abbildung 24 : CD68-Färbung bei den 3-Tages-Tieren; Makrophagen färben sich leuchtend rot

a)+b): Tiere mit EPCs und EPO
c)+d): Tiere mit EPCs ohne EPO

3.4 Ergebnisse des Vergleichs verschiedener Myokardinfarktmodelle: Modell der transienten Ligatur mit anschließender Reperfusion und des Modells der permanenten Ligatur der LAD

Der Versuch über die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt kam zu dem Ergebnis, dass die von uns induzierten Infarkte keine Änderung der globalen LVEF im Vergleich zum gesunden Tier bewirken und der Effekt des Erythropoietins in einer minimalen Verbesserung der regionalen Wandbewegung zu erkennen ist.

Aus diesem Grund haben wir entschlossen, einen weiteren Versuch durchzuführen, in dem das Myokardinfarktmodell einer permanenten Ligatur mit einem Reperfusionsmodell verglichen wurde. Mit diesem Versuch sollten größere Infarkte verursacht und eine gravierendere Verschlechterung der linksventrikulären Funktion provoziert werden, um in zukünftigen Versuchen eine deutlichere Verbesserung der linksventrikulären Funktion darstellen zu können

3.4.1 Ergebnisse in vivo

3.4.1.1 Entwicklung des Körpergewichtes

Innerhalb des Vergleichs der transienten Ligatur mit Reperfusion mit permanenter Ligatur der LAD beträgt das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten mit Ischämie/Reperfusion vor der Thorakotomie 252,16g, eine Woche post OP 249,7g und 4 Wo post OP 330,67g. Das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten mit Ligatur beträgt prä OP 266,2g, eine Woche post OP 256,2g und vier Wochen post OP 344,16g.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

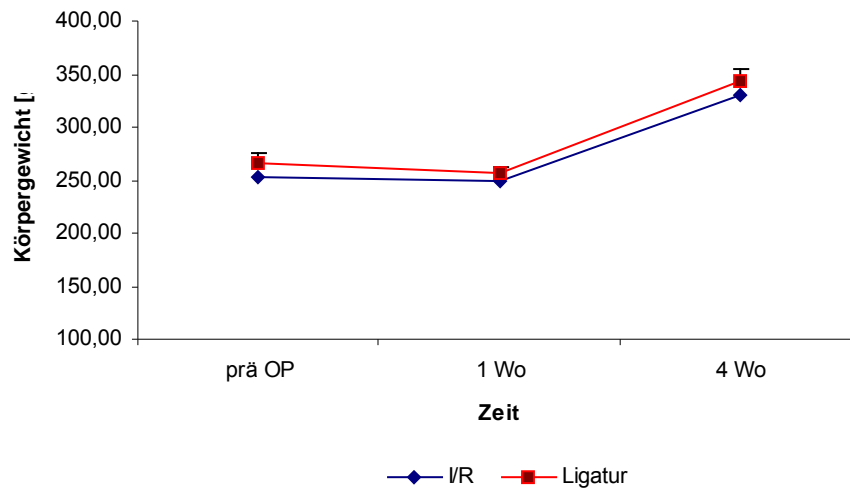


Diagramm 8 : Entwicklung des Körpergewichtes in Gramm im Ischämie/Reperusions-Ligatur-Versuch (prä OP, eine und vier Wochen post OP)

3.4.1.2 Mortalität

Von den insgesamt 21 operierten Tieren sterben 8. Das entspricht einer Mortalität von 38,1%. Von den verstorbenen Tieren erhielten 5 Tiere (23,8% der operierten Tiere) eine Ligatur und bei 3 Tieren (14,3% der operierten Tiere) wurde das Ischämie/Reperusionsmodell verwendet.

Von den verstorbenen Tieren wiesen drei Tiere einen hochgradigen, eines einen mittel- und vier einen geringgradigen Blutverlust auf.

Die Auswertung der Ergebnisse bezieht sich auf die 13 überlebenden Tiere, die verstorbenen Tiere werden nicht in die Auswertung einbezogen.

	<u>Ischämie/Reperfusion</u>		<u>Ligatur</u>		<u>p</u>
	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	
<i>Mortalität</i>	3	14,3	5	23,8	0,211

Tabelle 10 : Mortalitätsrate

3.4.1.3 Intraoperative Komplikationen

Bei einem (4,8%) von den 21 operierten Tieren wurde beim Eröffnen des Thorax die A. thoracica interna verletzt und es kam dadurch zu einem hochgradigen Blutverlust. 14 Tiere (66,7%) wiesen keinen oder nur einen geringgradigen, 2 Tiere (9,5%) einen mittelgradigen und 5 Tiere (23,8%) einen hochgradigen Blutverlust auf.

Bei einem der Tiere war eine Myokardblutung zu beobachten.

Kammerflimmern fiel bei keinem der Tiere auf.

	<u>Ischämie/Reperfusion</u>		<u>Ligatur</u>		<i>p</i>
	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	<u>Absolute Anzahl</u>	<u>%</u>	
Verletzung A.thorac. int.	-	-	1	4,8	0,74
Kammerflimmern	-	-	-	-	-
Myokardblutung	-	-	1	4,8	0,74
Blutverlust kein/ ggr.	6	28,6	8	38,1	0,651
Blutverlust mgr.	1	4,8	1	4,8	0,976
Blutverlust hgr.	3	14,3	2	9,5	0,786

Tabelle 11 : intraoperative Komplikationen

3.4.1.4 Untersuchungen im MRT

Die kernspintomographische Untersuchung wurde vier Wochen post OP durchgeführt. Es wurden jeweils die LVEF, das LVEDV, LVESV und die lokale Wandbewegung bestimmt.

3.4.1.4.1 LVEF

Die LVEF beträgt bei den Tieren mit Ischämie/Reperfusion im arithmetischen Mittel 49,34% ($\pm 1,92$), bei den Tieren mit Ligatur 32,45% ($\pm 1,9$). Somit ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p=0,0004$) zwischen der LVEF der Tiere, die nach dem Ischämie-Reperfusions-Modell operiert wurden und denen, die eine permanente Ligatur erhielten.

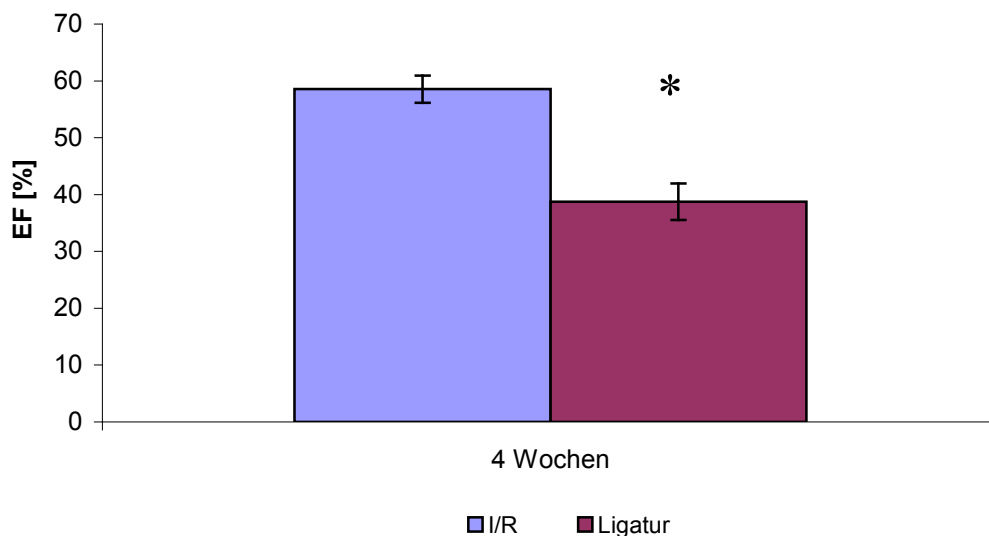


Diagramm 9 : LVEF in %

(*: $p < 0,05$)

	<u>I/R</u>	<u>SEM</u>	<u>Lig</u>	<u>SEM</u>	<u>p</u>
EF (in%)	49,34	1,92	32,45	1,9	0,0004

Tabelle 12 : Linksventrikuläre Auswurfsfraktion 4 Wochen post OP in%, mit dem MRT bestimmt
(SEM: Standardfehler)

3.4.1.4.2 Enddiastolische und –systolische Volumina

In der Ischämie/Reperfusionsgruppe haben die Tiere ein durchschnittliches LVEDV von 0,48 ml ($\pm 0,05$) und ein LVESV von 0,19 ml ($\pm 0,01$). Der prozentuale Anteil des LVESV am LVEDV beträgt 41,4% ($\pm 2,4$)

Die Tiere mit Ligatur zeigen durchschnittliches LVEDV von 0,68 ml ($\pm 0,2$) und ein LVESV von 0,41 ml ($\pm 0,10$). Der prozentuale Anteil des LVESV am LVEDV beträgt 61,2% ($\pm 3,2$). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den absoluten Werten.

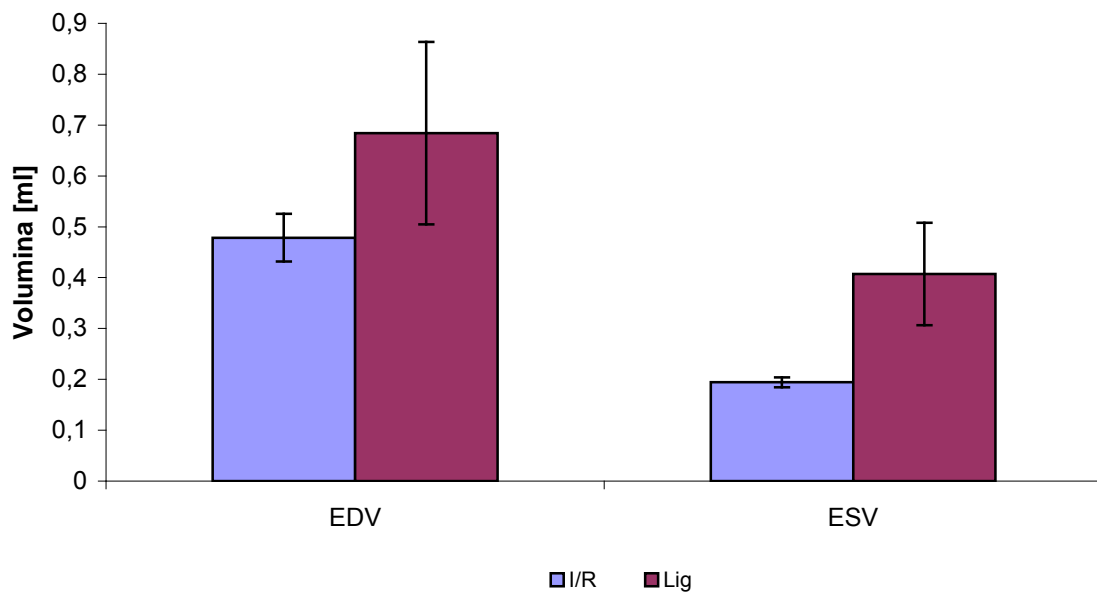


Diagramm 10 : Linsventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumina in ml vier Wochen post OP

3.4.1.4.3 Regionale Wandbewegung

Die regionale Wandbewegung wird mit dem MRT ermittelt (vgl. 3.2.4.3.3). Zur Darstellung der einzelnen Segmente nach dem 17-Segmentmodell verwendet man einen Zwei- und einen Vierkammerblick.

Zwischen den beiden Tiergruppen ist lediglich im anterobasalen Segment des Zweikammerblickes ein signifikanter Unterschied innerhalb der Kontraktionseigenschaft zu erkennen. In diesem Segment kontrahiert die Tiergruppe, die mit dem Ischämie-/Reperusionsmodell operiert wurde signifikant besser.

Die Gegenüberstellung aller anderen Segmente zwischen den beiden Tiergruppen ergibt sowohl im Vier- als auch im Zweikammerblick keine Signifikanz.

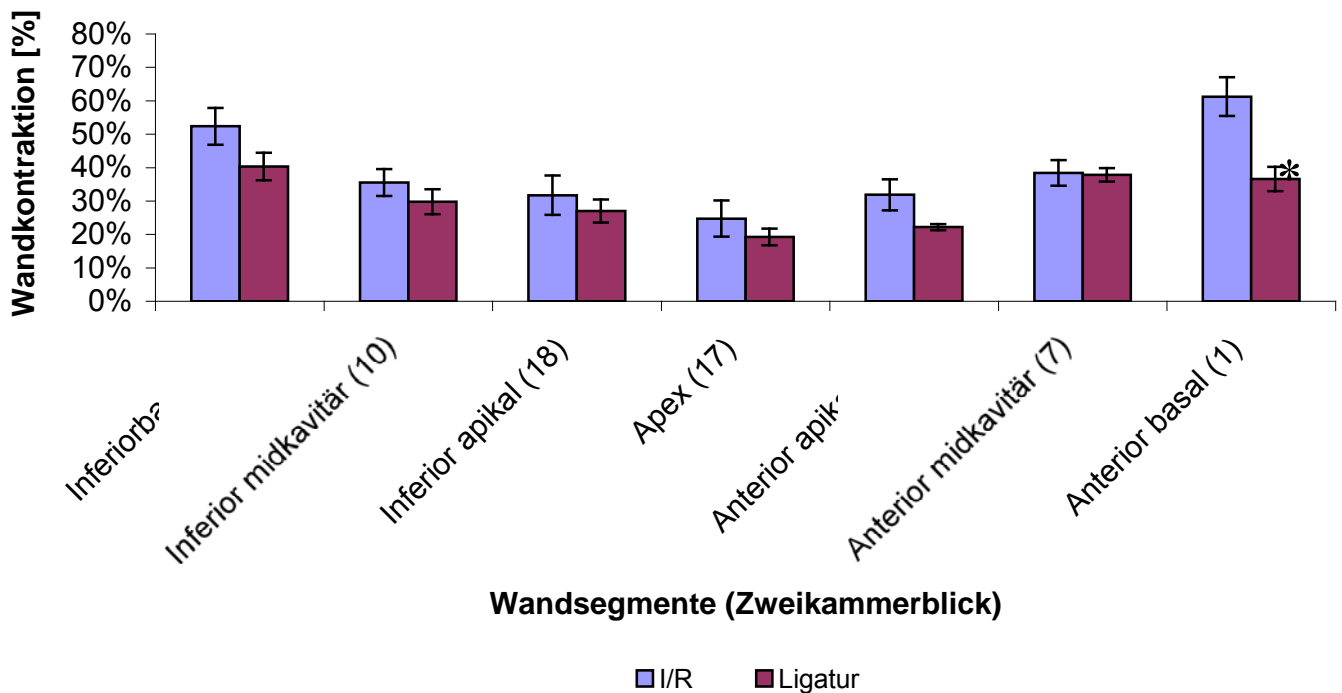


Diagramm 11: Regionale Wandbewegung in ml im Zweikammerblick

(*: $p=0,03$)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die regionale Wandbewegung der einzelnen Wandsegmente lässt sich folgendermaßen zusammenfassen:

<u>Zweikammerblick (Wandkontraktion in %)</u>			
	<u>I/R</u>	<u>Liq</u>	<u>p</u>
<u>4</u>	0,52	0,40	0,33
<i>SEM</i>	0,06	0,04	
<u>10</u>	0,36	0,30	0,62
<i>SEM</i>	0,04	0,04	
<u>15</u>	0,32	0,27	0,78
<i>SEM</i>	0,06	0,03	
<u>17</u>	0,25	0,19	0,87
<i>SEM</i>	0,05	0,02	
<u>13</u>	0,32	0,22	0,47
<i>SEM</i>	0,05	0,01	
<u>7</u>	0,38	0,38	0,60
<i>SEM</i>	0,04	0,02	
<u>1</u>	0,61	0,37	0,03
<i>SEM</i>	0,06	0,04	

Tabelle 13 : Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 4,10,15,17,13,7 und 1 im I/R-Lig-Versuch im Zweikammerblick (in %)

(SEM=Standardfehler)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die graphische Darstellung der Kontraktion der einzelnen Wandsegmente im Vierkammerblick wird in Diagramm 12 wiedergegeben. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.:

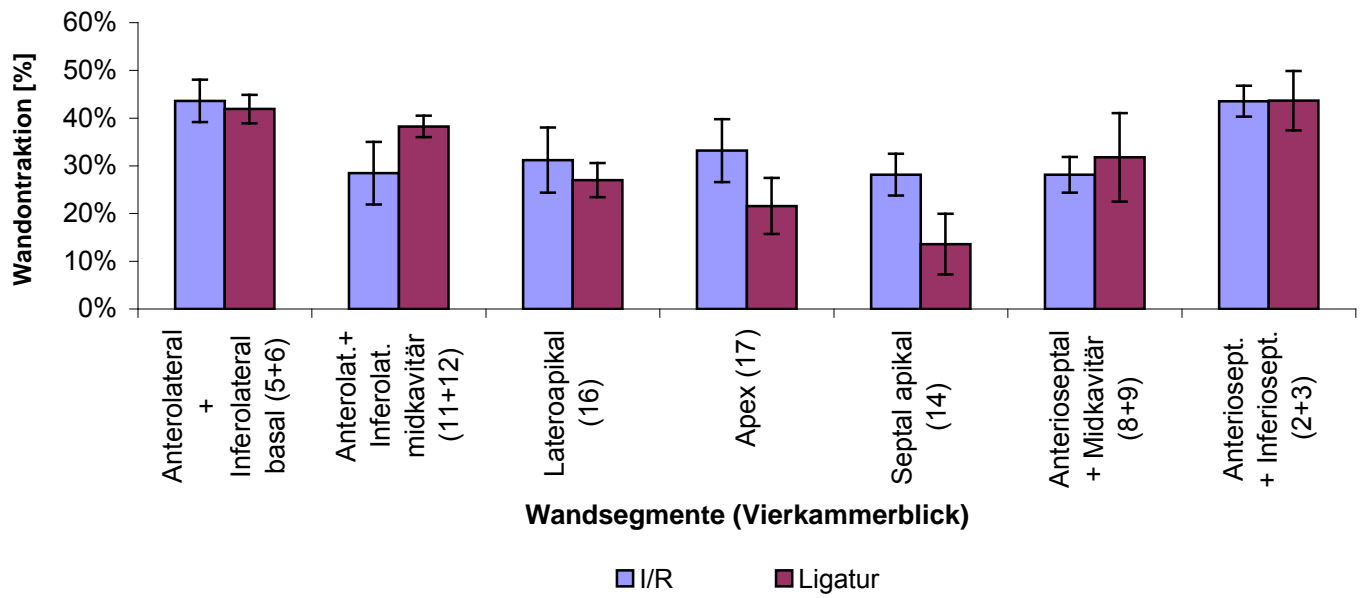


Diagramm 12: Regionale Wandbewegung in ml im Vierkammerblick

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die regionale Wandbewegung der einzelnen Segmente im Zweikammerblick ist folgend in Tabelle 14 dargestellt:

<u>Vierkammerblick (Wandkontraktion in%)</u>			
	<u>I/R</u>	<u>Lig</u>	<u>p</u>
<u>2+3</u>	0,44	0,44	0,86
<i>SEM</i>	0,03	0,06	
<u>8+9</u>	0,28	0,32	0,92
<i>SEM</i>	0,04	0,09	
<u>14</u>	0,28	0,14	0,35
<i>SEM</i>	0,04	0,06	
<u>17</u>	0,33	0,22	0,35
<i>SEM</i>	0,07	0,06	
<u>16</u>	0,31	0,27	0,68
<i>SEM</i>	0,07	0,04	
<u>11+12</u>	0,28	0,38	0,47
<i>SEM</i>	0,07	0,02	
<u>5+6</u>	0,44	0,42	0,95
<i>SEM</i>	0,04	0,03	

Tabelle 14 : Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 5+6, 11+12, 16, 17, 14, 8+9 und 2+3 im I/R-Lig-Versuch Im Vierkammerblick (in %)

(SEM=Standardfehler)

3.4.2 Ergebnisse ex vivo

3.4.2.1 Histopathologische Untersuchungen

3.4.2.1.1 Infarktgröße

Mit Hilfe der in 3.2.5.2.1 beschriebenen Masson Trichrom Färbung wird bei allen Tieren histologisch die absolute Infarktgröße ausgemessen und daraus die relative Infarktgröße als prozentualen Anteil des linken Ventrikels errechnet.

Das arithmetische Mittel der relativen Infarktgröße beträgt bei den Tieren mit Ischämie/Reperfusion 14,93% ($\pm 3,5$), bei den Tieren mit Ligatur dagegen 44,44% ($\pm 6,31$). Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,01$) zwischen den beiden Gruppen.

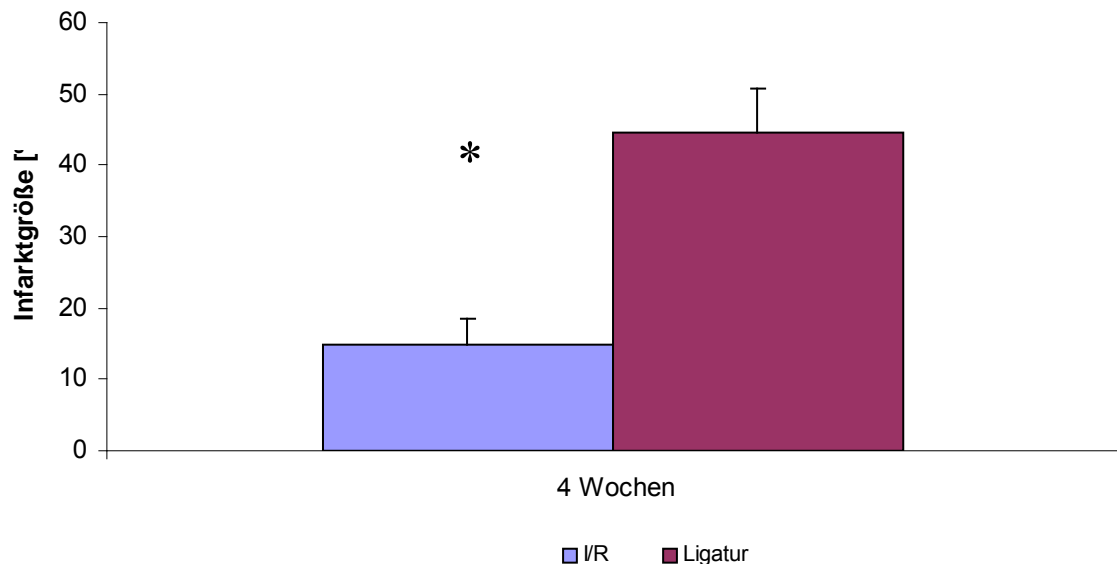


Diagramm 13 : relative Infarktgrößenach vier Wochen

(*: $p = 0,01$)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der Masson Trichrom Färbung stellt sich das infarzierte Areal blauviolett, das nicht ischämische Myokard dagegen rot dar (vgl. Abbildung 25).

Bei den Tieren mit permanenter Okklusion (Abbildung 25 a.) und b.)) ist neben einem größeren Infarktgebiet auch eine deutliche Wandasudnnung dieses Areals als bei den Tieren mit Ischämie/Reperfusion zu erkennen.

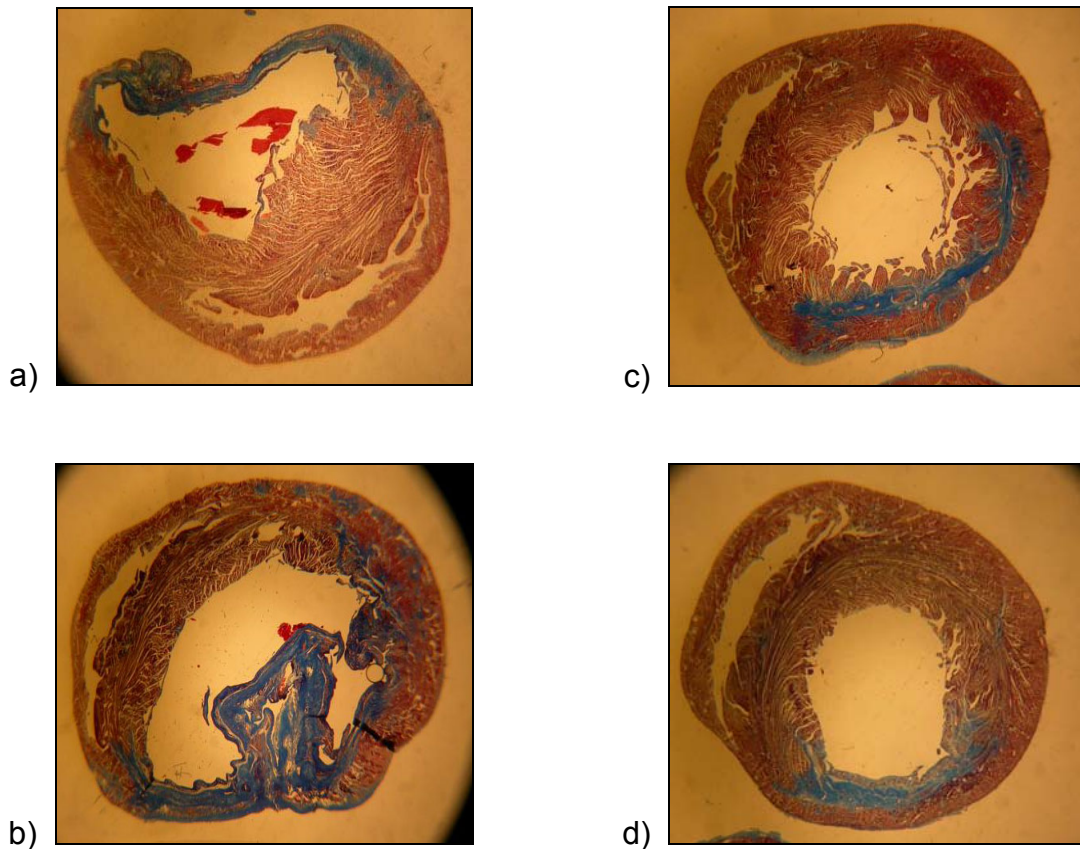


Abbildung 25 :Darstellung der Infarktgröße in der Masson Trichrom-Färbung bei Tieren mit permanenter Okklusion der LAD (a+b) im Vergleich zu Tieren mit Reperfusion (c+d)

3.4.2.1.2 Expansionsindex

Der Expansionsindex wird, wie in 3.2.5.5 beschrieben, aus dem Verhältnis der Größe der linken Ventrikelwand zum linken Ventrikellumen und aus den durchschnittlichen Wanddicken des infarzierten Gebietes berechnet.

Die Ratten mit Ischämie/Reperfusion weisen einen Expansionsindex von 36,84% (± 6), die mit Ligatur einen von 134% (± 33) auf. Es liegt ein signifikanter Unterschied ($p=0,049$) zwischen diesen beiden Gruppen vor.

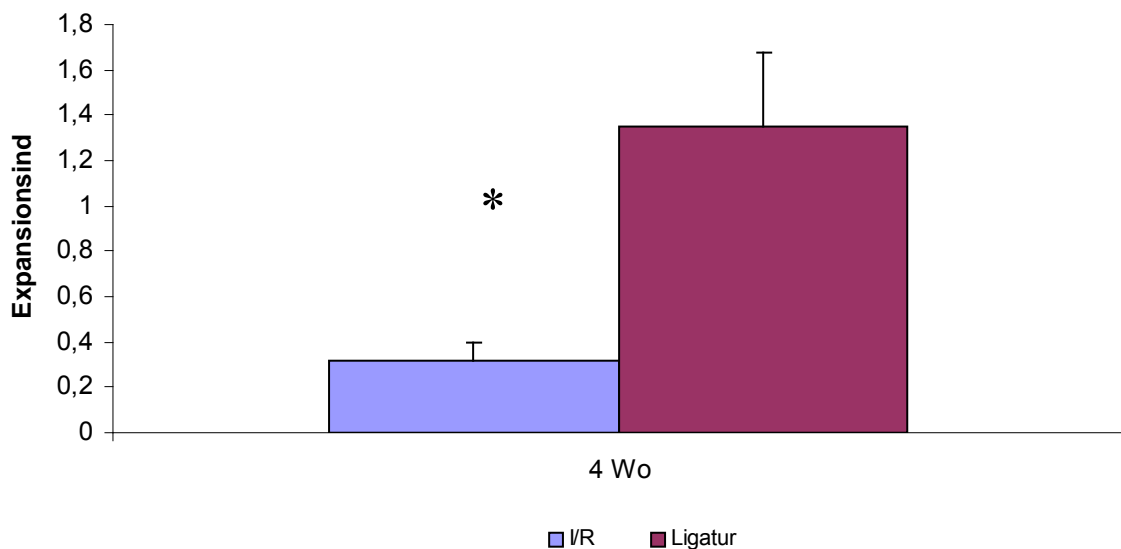


Diagramm 14 : Expansionsindex

(*: $p=0,049$)

3.4.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

3.3.3.2.1 Aktinfärbung

Zur Ermittlung der Gefäßdichte wurden die Präparate der 4-Wochen-Tiere, wie in 3.2.5.3.1 beschrieben, mit Hilfe eines Antikörpers gegen das α -smooth-muscle-Isotop des Aktins der glatten Muskelzellen angefärbt (Abb.23) und folgend (vgl. 3.2.5.4) ausgezählt.

Es ergab sich bei den Tieren, bei denen die LAD permanent ligiert wurde ein prozentualer Anteil von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet von 15,1% ($\pm 2,9$). In absoluten Zahlen ausgedrückt ergibt sich eine Anzahl von 57,08 ($\pm 5,49$) Gefäßen pro Gesichtsfeld. Diese setzt sich zusammen aus 35,17 ($\pm 3,28$) kleinen, 19,33 ($\pm 3,07$) mittelgroßen und 2,58 ($\pm 0,49$) großen Gefäßen.

Bei den Ratten, bei denen eine transiente Ligatur der LAD durchgeführt wurde, konnte eine prozentuale Anzahl von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet von 36,14% ($\pm 7,27$) festgestellt werden. In absoluten Zahlen ausgedrückt ergibt sich eine Anzahl von 48,38 ($\pm 5,84$) Gefäßen. Diese setzt sich zusammen aus 28,06 ($\pm 3,50$) kleinen, 16,69 ($\pm 2,15$) mittelgroßen und 3,63 ($\pm 0,61$) großen Gefäßen. Somit zeigen die Tiere, bei denen eine transiente Okklusion der LAD durchgeführt wurde einen signifikant höheren Anteil an großen Gefäßen ($p=0,04$) und einen signifikant höheren prozentualen Anteil der vaskulären Strukturen ($p=0,006$) im Bezug auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen im Randgebiet des Infarktes.

	<u>Liq</u>	<u>SEM</u>	<u>I/R</u>	<u>SEM</u>	<u>p</u>
<u>gr</u>	2,58	0,49	3,63	0,61	0,04
<u>mt</u>	19,33	3,07	16,69	2,15	0,84
<u>kl</u>	35,17	3,28	28,06	3,5	0,35
<u>Σ</u>	57,08	5,49	48,38	5,84	0,78
<u>%</u>	15,1	2,90	36,14	7,27	0,006

Tabelle 15 : : Auswertung der Gefäßdichte mit Hilfe der Aktinfärbung

(gr: große Gefäße, mt: mittelgroße Gefäße, kl: kleine Gefäße, Σ : Gesamtsumme der vaskulären Strukturen- jeweils gezählt im Randgebiet des Infarktes, %: prozentualer Anteil der vaskulären Strukturen im Bezug auf die Gesamtzahl der vorhandenen Zellen innerhalb eines Gesichtsfeldes im Randgebiet; SEM: Standardfehler)

4. Diskussion

4.1 Einleitung

In den letzten Jahren wurden vermehrt Versuche zur Regeneration der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt am Ischämie/Reperusionsmodell an der Ratte unter Verwendung von EPCs durchgeführt. So haben verschiedene Untersuchungen unter anderem ergeben, dass nach Ligatur der A. paraconaria sinistra und anschließender intramyocardialer Injektion von EPCs am Modell der Nacktratte eine gesteigerte Neovaskularisation im Randgebiet des Infarktes, eine verminderte myokardiale Fibrose und eine Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels zu beobachten waren (Kocher et al. 2001; Taguchi et al. 2004; Ott et al. 2005). Neben den positiven Effekten der EPCs auf die Regeneration nach Myokardinfarkt hat man in diesem Bereich noch weitere Untersuchungen durchgeführt. Unter anderem wurden dem Glykoprotein EPO eine kardioprotektive Wirkung und eine direkte Beeinflussung der EPCs nachgewiesen.

EPO induziert unter anderem die Mobilisierung von EPCs aus dem Knochenmark und beeinflusst die postnatale Vaskulogenese durch eine Steigerung der Anzahl und eine Verbesserung der Funktion von EPCs (Heeschen et al. 2003).

Weiterhin beeinflusst EPO neben der Aufrechterhaltung geschädigter Endothelzellen und der Vaskulogeneseinduktion in ischämischen Geweben auch direkt die Regeneration von Kardiomyozyten (Parsa et al. 2003; Cai and Semenza 2004). Parsa et al demonstrierten, dass die exogene intravenöse Zufuhr von EPO sowohl vor, als auch während der Ischämiephase vor Apoptose der Kardiomyozyten schützt und die Infarktgröße vermindert, was in einer verbesserten Funktion des linken Ventrikels resultiert und die Wiederherstellung der Herzleistung, inklusive der linksventrikulären Kontraktion verbessert (Parsa et al. 2004).

Neben diesen Effekten hat EPO auch eine antiinflammatorische Wirkung. Dies wurde von Liu et al in einem Versuch verdeutlicht, in dem EPO 24 Stunden vor Ligatur der LAD der Ratte intraperitonäal injiziert wurde. Diese Studie zeigt, dass die mit rhEPO behandelte Gruppe von Ratten eine signifikante Reduktion der Expression von myokardialen proinflammatorischen Mediatoren und eine verminderte Gewebsinfiltration von neutrophilen Granulozyten aufweist (Liu et al. 2006), was die antiinflammatorische, kardioprotektive Wirkung von EPO verdeutlicht.

DISKUSSION

Aus diesen Gründen haben wir versucht, die Regeneration nach Myokardinfarkt durch intramyokardiale Injektion von mit EPO vermischten EPCs positiv zu beeinflussen.

Zunächst haben wir das in der Literatur als Standard beschriebenes Modell der Ischämie/Reperfusion verwendet. Da wir damit jedoch nicht die gewünschte Verschlechterung der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt erreicht haben, beschlossen wir für weitere Versuche ein zweites Modell mit permanenter Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra (LAD) im Vergleich zum Ischämie/Reperusionsmodell zu testen.

4.2 Versuchsmodelle

Der Versuch über die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt kam zu dem Ergebnis, dass die von uns induzierten Infarkte kaum eine Änderung der globalen LVEF im Vergleich zum gesunden Tier bewirken und der Effekt des Erythropoietins lediglich innerhalb der Verbesserung der regionalen Wandbewegung zu erkennen ist.

Physiologische Werte der LVEF/LVFS bei der Ratte wurden bereits in vorherigen Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe untersucht (Weidl 2007).

Aus diesem Grund haben wir entschlossen, einen weiteren Versuch durchzuführen, in dem das Myokardinfarktmodell einer permanenten Ligatur mit einem Reperusionsmodell verglichen wurde. Hierdurch sollten größere Infarkte verursacht und eine gravierendere Verschlechterung der linksventrikulären Funktion provoziert werden, um in zukünftigen Versuchen eine deutlichere Verbesserung der linksventrikulären Funktion darstellen zu können.

Nach dem Versuch, in dem die permanente Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra mit dessen Reperfusion verglichen wurde ist zu erkennen, dass die Tiergruppe mit einer permanenten Okklusion signifikant größere Infarkte und eine schlechtere LVEF aufweist. Die Tiere mit Reperfusion dagegen zeigen relativ kleine Infarkte und eine nahezu physiologische LVEF vier Wochen post operationem. Aus diesem Gesichtspunkt sollte in weiteren Versuchen das Ligaturmodell verwendet werden, da hierbei theoretisch eine deutlichere Änderung der Infarktgröße und der Herzfunktion zu erkennen sein müsste.

DISKUSSION

Allerdings ist bei den durchgeführten Versuchen auch die Pathogenese der zu untersuchenden Erkrankung zu beachten. So sind Kardiomyozyten in der Lage, kurze, vorübergehende Ischämiephasen zu tolerieren. Jedoch führt diese Ischämie, auch wenn sie keinen Zelltod zur Folge hat, zu einer Schädigung der Myozyten. Im Hundeherz bewirkt eine totale Okklusion der Koronararterie innerhalb einer Dauer von 15 Minuten eine reversible Schädigung der Kardiomyozyten, eine Okklusion über einen längeren Zeitraum als 15 Minuten bewirkt irreversible Schäden am Myokard, die umso gravierender sind, je länger die Okklusion beibehalten wird (Kloner et al. 1974; Jennings et al. 1990).

Weiterhin ist das Modell der transienten Ligatur das Modell der Wahl, um Therapien für Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit Reperfusionsschaden zu entwickeln (Wayman et al. 2003), da es der klinischen Situation eher entspricht als eine permanente Ligatur eines Koronargefäßes, was in unseren Untersuchungen das Ziel war.

Ein Vorteil des Ischämie/Reperusionsmodells ist die geringe Mortalitätsrate, die bei der Ligaturgruppe deutlich höher war, als bei der Ischämie/Reperusionsgruppe. Dies deckt sich auch mit anderen Versuchen von Ye et al und Kompa et al, bei denen die perioperative Mortalität nach Okklusion 10-50% beträgt und die nach Ischämie/Reperfusion als weitaus geringer beschrieben ist (Ye et al. 1997; Kompa and Summers 2000).

Weiterhin ist die intramyokardiale Injektion von EPCs im Gegensatz zu der wesentlich häufiger verwendeten intravenösen Injektion zu diskutieren. Da durch die entstandene Ischämie im Myokard eine verminderte Perfusion in den geschädigten Arealen resultiert und deshalb nur eine verminderte Anzahl der insgesamt zur Verfügung stehenden EPCs in das ischämische Gebiet transportiert werden kann (Rafii and Lyden 2003), erscheint eine lokale Applikation durchaus sinnvoll. So kann eine direkte Transplantation der Zellen in einer ausreichenden Konzentration in das geschädigte Gewebe erfolgen.

Weitere positive Ergebnisse erhielten Kawamoto et al , indem sie frisch isolierte CD34+ Zellen in das ischämische Randgebiet nach durch Platzierung eines Ameroidkonstriktors induzierten Myokardinfarkt bei der Nacktratte injizierten. Hierbei wurde beobachtet, dass sich die EPCs in das Myokard einfügen, zu maturen Endothelzellen differenzieren und eine Gefäßneubildung im ischämischen Randgebiet fördern (Kawamoto et al. 2003). Weiterhin konnten eine verbesserte

DISKUSSION

linsventrikuläre Funktion und eine verminderte Fibroserate festgestellt werden. Diese Ergebnisse waren allerdings vergleichbar mit anderen Studien, in denen EPCs intravenös verabreicht wurden (Kawamoto et al. 2001; Kocher et al. 2001).

Ein Unterschied besteht allerdings in der Konzentration der injizierten EPCs, da bei der intramyokardialen Injektion ein um das zwanzigfache geringere Zellzahl (10^5 CD34+ MNCs in 100 μ l PBS) notwendig war, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten (Kawamoto et al. 2003).

4.3 Wirkungen einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von endothelialen Progenitorzellen im akuten Myokardinfarkt

Im Gegensatz zu anderen Studien, die endotheliale Progenitorzellen aus peripherem Blut oder Knochenmark isolieren, verwenden wir Nabelschnurblut und expandieren die Zellen über Wochen. Da diese Methode der Zellgewinnung die am wenigsten invasive ist und die aus Nabelschnurblut stammenden EPCs, im Gegensatz zu aus peripherem Blut oder Knochenmark isolierten endothelialen Progenitorzellen, eine höhere Proliferationsrate aufweisen. Dadurch zeigt sich beim Expandieren der Zellen eine größeren Anzahl von Zellkolonien, eine gesteigerte Zellzyklusrate, ein höheres Selbsterneuerungspotential und längere Telomere mit gesteigerter Aktivität (Mayani and Lansdorp 1994; Vaziri et al. 1994; Ott et al. 2005).

Weiterhin befindet sich im Nabelschnurblut die zehnfache Menge an EPCs, im Vergleich zum peripheren Blut (Asahara et al. 1999). Obwohl eine größere Menge an peripherem Blut gewonnen werden kann, ist die Gesamtzahl der zu expandierenden Zellen aus beiden Quellen vergleichbar, da die Population der CD 34+, aus peripherem Blut gewonnenen Zellen ca. 16 mal Verdoppelt werden kann, die aus Nabelschnurblut dagegen bis zu 46 mal. Daraus ergibt sich, dass aus Kulturen von aus peripherem Blut stammenden CD34+ Zellen $1,0 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$ Endothelzellen expandiert werden konnten, aus Nabelschnurblut stammenden CD34+ Zellen dagegen 10^{12} bis 10^{20} . Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass CD34+ Zellen sowohl aus peripherem, als auch aus Nabelschnurblut zu klinisch relevanten Zellzahlen differenziert und expandiert werden können (Ott et al. 2005).

Wie in dieser Studie wurde schon in vorherigen Studien kultivierten endothelialen Progenitorzellen EPO zugesetzt. So untersuchten Muller-Ehmsen et al die Auswirkung von EPO, welches über 48 Stunden mit für drei Tagen kultivierten humanen EPCs inkubiert wurde. Bei diesem Versuch konnte eine geringgradige Steigerung der Proliferationsrate und eine geringgradige Reduktion der Apoptoserate, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen, beobachtet werden. Wurden die endothelialen Progenitorzellen erst nach fünf Tagen mit EPO vermischt, waren keine Auswirkungen auf die Zellpopulation nachweisbar (Muller-Ehmsen et al. 2006). In unserer Studie mischen wir EPO mit über sieben Wochen kultivierten EPCs

DISKUSSION

und injizieren diese sofort, was die positive Wirkung des EPO auf die endothelialen Progenitorzellen deutlich vermindern könnte.

Weiterhin wurde bisher bei der Kultivierung von EPCs mit EPO meist eine Konzentration von 0,5 IU/ml EPO genutzt (Ribatti et al. 1999; Muller-Ehmsen et al. 2006). Ribatti und Mitarbeiter haben in einer Studie die Auswirkung verschiedener EPO-Konzentrationen (0,5-40 IU/ml) auf kultivierte Endothelzellen untersucht und herausgefunden, dass die Proliferationsrate dieser Zellen ihr Maximum bei 5 IU/ml zeigt, bei höheren Konzentrationen dagegen wieder sinkt (Ribatti et al. 1999).

In unserer Studie verwenden wir eine hohe Konzentration von 50 IU/ml, um einen anhaltenden Effekt im Gewebe zu erreichen. Diese Menge an EPO sollte kritisch betrachtet werden, da nicht genau bekannt ist, welche Folgen eine so hohe Dosis von EPO auf kultivierte endotheliale Progenitorzellen bewirkt.

4.3.1 Ergebnisse in vivo

4.3.1.1 Körpergewichte

Obwohl sich die Tiere auf Grund ihres Alters noch im Wachstum befinden, ist ein Rückgang bzw. eine Stagnation des Körpergewichtes in der ersten Woche nach der Operation zu verzeichnen. Nach ca. sieben Tagen nehmen die Tiere wieder kontinuierlich an Gewicht zu. Diese Entwicklung des Körpergewichtes ist auf den postoperativen Stress und die damit zusammenhängende verminderte Nahrungsaufnahme in den ersten Tagen nach dem Eingriff zurückzuführen.

4.3.1.2 Mortalität

Von den insgesamt 41 operierten Tieren starben 8 innerhalb der ersten 24 Stunden post operationem. Das entspricht einer Mortalität von 19,5%. Dabei zeigt sich eine höhere Mortalität bei den Tieren, denen EPO und endotheliale Progenitorzellen injiziert wurden, die jedoch statistisch kein Signifikanzniveau erreichte..

Eine mögliche Ursache für die höhere Mortalität der Tiere mit einer zusätzlichen Gabe von EPO könnte die dosisabhängige Beeinflussung der Anzahl und der

DISKUSSION

Aktivität der Thrombozyten und die Stimulation der Plättchenadhäsion an verletzten oder auch nicht verletzten Endothelien beachtet werden (Stohlawetz et al. 2000; Fuste et al. 2002). So ist es denkbar, dass sich neben der künstlich gesetzten Okklusion noch weitere Mikrothromben im Bereich des Myokards bilden und somit eine größere als die beabsichtigte Schädigung hervorrufen, was wiederum zu Todesfällen führen kann.

Weiterhin muss ein durch EPO verursachter massiver Anstieg des Hämatokrits bei nicht anämischen, gesunden Ratten in Betracht gezogen werden. Dies ist in Hinsicht auf die rheologischen Eigenschaften des Blutes nicht wünschenswert und kann die durch den Myokardinfarkt verursachte Gewebsschädigung noch verschlimmern. Nach Ehrenreich et al provoziert allerdings auch bei nicht anämischen Menschen nur eine chronische, systemische Gabe von EPO einen Anstieg der Gesamterythrozytenmasse im peripheren Blut. In dessen Studie wurden nicht anämischen Schlaganfallpatienten an drei Folgetagen 3×10^4 IU EPO/Mensch intravenös verabreicht, ohne Nebenwirkungen zu provozieren (Ehrenreich et al. 2002).

4.3.1.3 Intraoperative Komplikationen

Die häufigste intraoperative Komplikation ist eine durch den Chirurgen verursachte Verletzung der A.thoracica interna, wodurch es während der Eröffnung des Thorax zu einer hochgradigen Blutung kommt, die häufig letal endet. Diese Blutung trat häufiger (bei 7,3%) bei den Tieren, denen EPO injiziert wurde auf.

Eine weitere Komplikation ist das Kammerflimmern, das bei 10% der Tiere zu beobachten ist. Kammerflimmern tritt meist in dem Moment auf, in dem das Myokard manipuliert wird, sei es durch das Durchstechen des Myokards zum Anbringen der Ligatur oder durch das Injizieren der Zellen. Hierbei konnte keine Unterschied zwischen der Injektion von reinen EPCs oder von mit EPO vermischten Zellen beobachtet werden und ist somit auf die Traumatisierung des Myokards zurückzuführen.

Somit sind die intraoperativen Komplikationen der beiden Gruppen vergleichbar.

4.3.1.4 Untersuchungen im MRT

Zu Untersuchung der linksventrikulären Funktion haben wir die Magnetresonanztomographie (MRT) gewählt, da dieses Verfahren mittlerweile als „gold standard“ in der kardialen Funktionsdiagnostik gilt. Obwohl die Echokardiographie eine weit verbreitete, kostengünstige und wenig invasive Methode darstellt, ist sie kritisch zu betrachten, da sie sehr abhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist. Weiterhin wird die Qualität des Bildes auch von den Körperkonditionen des Patienten und individuellen anatomischen Unterschieden beeinflusst. Selbst bei Patienten, bei denen eine gute Darstellung des Herzes möglich ist, sind inferobasale Anteile oft schlecht einzusehen. Bei Patienten mit verändertem Myokard, wie z.B. bei Narbenbildung, sind die Ergebnisse der Echokardiographie im Vergleich zum gesunden Patienten noch ungenauer (Hazirolan et al. 2007). Letztendlich ist auch die regionale Wandbewegung nur unzureichend beurteilbar, da dieses Verfahren mittels Echokardiographie nicht quantifiziert ist.

Die Untersuchung im MRT dagegen ist unabhängig von individuellen anatomischen Variationen und es können alle Bereiche des Myokards gut eingesehen werden. Das LVEDV, LVESV, die EF, das Schlagvolumen, so wie systolische und diastolische Wanddicken werden mit 8-12 Schichten in der kurzen Achse bestimmt. Es werden Schnittbilder des gesamten Ventrikels angefertigt und daraus eine dreidimensionale Darstellung rekonstruiert, was genauere Ergebnisse als die Echokardiographie ermöglicht. Aus diesen Gründen ist die MRT als „gold standard“ für die Evaluierung kardialer Funktion angesehen (Orlic et al. 2002; Hazirolan et al. 2007).

4.3.1.4.1 EF und Volumina

Die Reaktion des Herzens auf einen Myokardinfarkt besteht in einem Remodelingprozess. Dieses Remodeling ist durch eine Expansion des Infarktareals, einer progressiven Dilatation des linken Ventrikels, einer vorübergehenden Hypertrophie des sichtbaren Myokards und einer Hyperplasie der interstitiellen Fibroblasten gekennzeichnet. Diese Veränderungen führen zu einer Dysfunktion des linken Ventrikels, welche schließlich im chronischen Herzversagen enden kann (Mill

DISKUSSION

et al. 1990; Pfeffer et al. 1991). Dies äußert sich in erhöhten Herzvolumina (LVEDV; LVESV) und in einer verminderten EF. Die erhöhten Werte des LVESV und LVEDV sind Folgen der Wandausdünnung und der daraus resultierenden Ventrikeldilatation, was sekundär auch zu einer verminderten Herzkontraktion und damit zu einer verminderten Auswurfleistung, die sich in einer erniedrigten EF äußert, führt. Der Remodelingprozess scheint sowohl abhängig von der Infarktgröße, als auch von der bestehenden Vor- und Nachlast des Herzen zu sein (Pfeffer et al. 1979; Fletcher et al. 1981).

Innerhalb des Versuches, der die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von endothelialen Progenitorzellen untersucht, ergibt sich bei der globalen EF kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die lediglich endotheliale Progenitorzellen erhalten und den Tieren, bei denen EPCs und EPO injiziert werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem der Infarktgröße und des Expansionsindex überein. In beiden Fällen sind jeweils keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (eine größere Infarktgröße, bzw. ein größerer Expansionsindex) zu erkennen.

In der Gruppe, die endotheliale Progenitorzellen und EPO erhielten, beobachten wir eine signifikante Verbesserung in der Gefäßneubildung. Dies könnte sich auf die langfristige Verbesserung der globalen EF auswirken. Aus diesem Grund sollte in weiteren Versuchen ein längerer Untersuchungszeitraum als die von uns verwendeten vier Wochen gewählt werden, um auch die Langzeitwirkung der lokalen EPO-Injektion zu untersuchen.

Innerhalb des Versuches (sowohl des 3-Tages-, als auch des 4-Wochen-Versuches) ist kein signifikanter Unterschied innerhalb des LVESV oder des LVEDV zwischen den Tieren, die EPO erhielten und denen, denen lediglich EPCs injiziert wurden zu erkennen. Es besteht allerdings ein Hinweis darauf, dass die Tiere, die EPO erhielten eine etwas schlechtere Hämodynamik aufweisen. Dies könnte mit der Tatsache der von uns gezeigten höheren Infiltration von Makrophagen in das Infarktgebiet bei der EPO-Gruppe in Verbindung gebracht werden. So wäre es möglich, dass durch eine gesteigerte inflammatorische Reaktion das Remodeling behindert und dadurch die Herzfunktion nach vier Wochen noch negativ beeinflusst wird. Auch in diesem Fall wäre eine weitere Messung der Hämodynamik nach einer längeren Zeitspanne sinnvoll, um die Langzeitwirkung der EPO-Injektion zu untersuchen.

4.3.1.4.2 regionale Wandbewegung

Da bei der globalen EF kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu erkennen war, untersuchten wir zusätzlich die regionale Wandbewegung.

Die regionale Wandbewegung wird nach dem 17-Segment-Modell und der Nomenklatur der „American Heart Association“ ausgewertet. Sie beschreibt die regionale Wandbewegung innerhalb exemplarisch gewählter sieben Segmente der Wand des linken Ventrikels (Cerqueira et al. 2002). Je höher der einzelne Wert, desto stärker kontrahiert sich das jeweilige Segment. Erwartet wird eine im Vergleich zu den basalen Segmenten verminderte Kontraktilität der apikalen Vorderwandsegmente, also der, in denen sich der Hauptanteil des infarzierten Gewebes befindet.

Es konnten geringfügige Unterschiede innerhalb der regionalen Wandbewegung nach vier Wochen zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. So zeigen die Tiere, die EPO erhielten eine bessere Kontraktion der Vorderwand (Segmente 16 und 11+12 im Vier- und Segmente 1, 7 und 13 im Zweikammerblick), die, denen lediglich EPCs injiziert wurden eine bessere Kontraktion der Hinterwand (Segmente 2+3 und 8+9 im Vier- und Segmente 4 und 10 im Zweikammerblick). Zu bedenken bleibt jedoch, dass bisher eine Validierung dieser Methode nicht erfolgt ist und der Vergleich der regionalen Wandbewegung im Vergleich der Tiere mit Ischämie und Reperfusion und Ligatur nur geringe Unterschiede zeigt, im Gegensatz zu globaler EF und Infarktgröße.

Trotz dessen sehen wir innerhalb der restlichen Funktionsparameter (LVEF, LVEDV, LVESV) keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Tiere, die EPO erhielten könnten bei einer annähernd gleichen Infarktgröße eine bessere Kontraktion des infarzierten Areals aufweisen, die Tiere ohne EPO könnten den Kontraktionsverlust der Vorderwand durch eine hyperkinetische Hinterwand ausgleichen und durch diesen Effekt eine vergleichbare LVEF erreichen.

4.3.2 Ergebnisse ex vivo

4.3.2.1 Histopathologische Untersuchungen

4.3.2.1.1 Infarktgröße

Die Infarktgrößen zwischen den Tieren, bei denen lediglich EPCs injiziert wurden und denen, denen EPCs und EPO verabreicht wurden zeigen keinen signifikanten Unterschied.

Jedoch differieren die Infarktgrößen zwischen der 3-Tages-Gruppe und der 4-Wochen-Gruppe signifikant. So haben sowohl die Tiere der 3-Tages-Gruppe, denen lediglich EPCs, als auch die, denen EPCs und EPO injiziert wurden eine signifikant größere Infarktgröße als die Tiere der 4-Wochen-Gruppe.

Der Unterschied zwischen der 3-Tages-Gruppe und der 4-Wochen-Gruppe ist auf die nach drei Tagen noch deutlich darzustellende Entzündungsreaktion im Perinfarktgebiet zurückzuführen, die durch die Masson Trichrom Färbung ebenfalls angefärbt wird. Histopathologisch ist im Myokard sechs Stunden (akuter Infarkt) nach Verschluss eines Gefäßes eine verstärkte Eosinophilie des Zytoplasmas im Infarktgebiet mit welliger Myozytenordnung zu erkennen. Nach 24 Stunden löst die Nekrose im Perinfarktgebiet eine exsudative Entzündungsreaktion mit Hyperämie und Leukozytenmigration aus, es erscheint eine hyperämische Randzone. Nach vier Tagen (subakuter Infarkt) beginnt der Wundheilungsmechanismus mit proteolytischer Auflösung der Nekrose und der Organisation durch Granulationsgewebe aus der perinekrotischen Zone. Nach sechs Wochen (alter Infarkt) ist die Infarktzone vollständig narbig ersetzt (Riede 1998).

4.3.2.1.2 Expansionsindex

Der Expansionsindex wird aus dem Produkt aus dem Verhältnis des Lumens des linken Ventrikels zu dessen Gesamtvolumen (relative Größe der Kavität) und aus dem Verhältnis der Septumdicke zur Dicke der linken Ventrikelwand (Ausdünnungsverhältnis) im Infarktgebiet berechnet. Die relative Größe der Kavität zeigt den Grad der Ausdehnung des Ventrikels. Das Ausdünnungsverhältnis ist ein

DISKUSSION

Parameter für die Abnahme der Wanddicke des linken Ventrikels im Infarktgebiet (Pfeffer and Braunwald 1990).

Der Expansionsindex ist folglich ein Wert, welcher die Wandausdünnung und die Ventrikeldilatation mit einbezieht. Er steigt an, je dünner die Ventrikelwand im Infarktgebiet wird und je weiter der linke Ventrikel sich dilatiert. Diese beiden Faktoren können Komplikationen des Myokardinfarktes darstellen, die mit einer erhöhten Mortalität, einer Verschlechterung der hämodynamischen Parameter (LVEDV, LVESV) und mit einer Ruptur des linken Ventrikels korrelieren (Erlebacher et al. 1982; Meizlish et al. 1984). Ein erhöhter Expansionsindex entsteht durch Ausdehnung und Mikrorisse innerhalb der Myofibrillen. Weitere Faktoren, die hiermit korrelieren sind die Infarktgröße und die Transmuralität des Infarktes. In diesem Zusammenhang wird auch die Anwendung antiinflammatorischer Medikamente diskutiert, da es Hinweise darauf gibt, dass die Gabe von Antiphlogistika den Expansionsindex durch die Unterdrückung der Entzündungsreaktion und ein dadurch vermindertes Remodeling im Infarktgebiet negativ beeinflussen kann (Eaton and Bulkley 1981; Hammerman et al. 1984). Den Ratten unserer Studie wurden ebenfalls antiinflammatorische Medikamente verabreicht (Metamizol), deshalb sollte in Betracht gezogen werden, dass der Expansionsindex ohne diese Medikation eventuell geringer ausgefallen wäre. Da allen Tieren in beiden Gruppen jedoch die selben Medikamente in der gleichen Dosis verabreicht wurden, sollte dies keinen Einfluss auf das Verhältnis der Ergebnisse der einzelnen Gruppen zueinander haben. Weiterhin werden in der Humanmedizin ebenfalls antiphlogistische und antiinflammatorische Medikamente eingesetzt, weshalb die Gabe dieser Medikamente keinen Einfluss auf die klinische Relevanz haben sollte. Nicht zuletzt darf auch aus tierschutzrechtlicher Sicht auf keinen Fall auf eine Analgesie verzichtet werden.

Weiterhin kann sich eine Therapie mit Antiphlogistika auf den Heilungsprozess durch die Beeinflussung der topographischen Veränderungen innerhalb des Ventrikels auswirken (Pfeffer and Braunwald 1990). In mehreren experimentellen Infarktmodellen wurde bestätigt, dass die Therapie mit Glukokortikoiden und nichtsteroidalen Antiphlogistika während der akuten Phase des Infarktes eine Ausdünnung der Narbenregion und einen gesteigerten Expansionsindex zur Folge hat (Brown et al. 1983; Hammerman et al. 1983; Jugdutt 1985). Die Behandlung mit antiinflammatorischen Medikamenten verzögert möglicherweise die Wundheilung

DISKUSSION

und ermöglicht dadurch eine zeitlich längere Anfälligkeit des geschädigten Myokards gegenüber einer Dehnung des Ventrikels als bei unbehandelten Tieren (Pfeffer and Braunwald 1990).

Sowohl innerhalb der 3-Tages-, als auch innerhalb der 4-Wochen-Gruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Expansionsindexes. Da EPO auch eine antiinflammatorische Wirkung zugeschrieben wird, wäre eine ähnliche Wirkung wie die der oben genannten Medikamente denkbar. Um die genauen Mechanismen, die zu diesem Ergebnis führen erklären zu können, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Eine weitere Möglichkeit für die schlechteren Werte der Tiere, denen EPO injiziert wurde, könnte die vermehrte Akkumulation von Makrophagen im Randgebiet des Infarktes sein. Dies könnte durch einen ähnlichen theoretischen Mechanismus wie der der Makrophagenrekrutierung (siehe 4.4.2.2) beeinflusst werden, also eine durch EPO verursachte verminderte Apoptoserate der Kardiomyozyten und dadurch bedingte verlängerte Inflammation im infarzierten Myokard und verzögerte Wundheilung.

4.3.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen

4.3.2.2.1 Aktin

Bei der Aktinfärbung wird ein gegen das α -smooth-muscle-Isotop des Aktins der glatten Muskelzellen gerichteter Antikörper verwendet. Hiermit lassen sich glatte Muskelzellen der arteriellen Gefäße sehr gut darstellen.

Innerhalb der Anzahl von kleinen und mittelgroßen Gefäßen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Jedoch zeigten die Tiere, die EPO erhielten einen signifikant höheren Anteil an großen Gefäßen ($p=0,01$) und einen signifikant höheren prozentualen Anteil von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet ($p=0,01$).

Der bei den Tieren, die EPO erhielten höhere prozentuale Anteil von Gefäßen kann mit der proangiogenetischen Eigenschaft von EPO begründet werden. EPO spielt eine duale Rolle innerhalb der Protektion von Gefäßen (Chong et al. 2002). Einerseits besitzt es eine direkte biologische Wirkung auf reife Endothelzellen.

DISKUSSION

Neben der Stabilisierung endothelialer Strukturen und der Gefäßintegrität werden Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte gefestigt (Fliser et al. 2006). Dadurch sind die Endothelzellen weniger anfällig für ischämieinduzierten Zelltod, z.B. nach myokardialer Ischämie (Carlini et al. 1995).

Andererseits führt es auch zur Bildung neuer Kapillaren, ausgehend von präexistenten Gefäßen innerhalb eines avaskulären Gebietes (Angiogenese) (Chong et al. 2002; Chong et al. 2002), was beim Remodeling nach Myokardinfarkt eine entscheidende Rolle spielt.

Strohlawetz et al wiesen in vivo die Aktivierung von Endothelzellen nach intravenöser rhEPO Injektion nach. In dieser Studie wurden gesunden Probanden 100 bzw. 500 U/kg rhEPO dreimal pro Woche injiziert. Bei den Versuchspersonen wurde eine dosisabhängige Steigerung von gelöstem E-Selektin von bis zu 100% bei der Gruppe, die 500IU/Kg erhielten festgestellt. Auch in der Gruppe, der nur 100 IU/kg verabreicht wurde, wurde ein signifikanter, wenn auch geringerer Anstieg verzeichnet (Strohlawetz et al. 2000). So ist es durchaus möglich, dass auch die von uns injizierte Menge an EPO eine proendotheliale Wirkung zeigt.

Weiterhin übt EPO auch eine protektive Wirkung auf EPCs aus. Durch die gemeinsame Injektion von EPCs und EPO könnte sich dieser protektive Effekt direkt auswirken und zu einer gesteigerten Überlebensrate der injizierten EPCs führen, was den proangiogenetischen Effekt der EPCs verstärken könnte. Schon die alleinige Injektion frisch isolierter CD34+ Zellen in das ischämische Randgebiet nach Myokardinfarkt bei der Nacktratte bedingt, dass sich die EPCs in das Myokard einfügen, zu maturen Endothelzellen differenzieren und eine Gefäßneubildung im ischämischen Randgebiet fördern (Kawamoto et al. 2003). In der Verbindung mit lokal appliziertem EPO könnte dieser Effekt noch gesteigert werden.

4.3.2.2.2 CD68

Bei der CD68 Färbung wird ein Antikörper gegen das bei Makrophagen stark exprimierte lysosomale Antigen CD68 verwendet, wodurch sich die Makrophagen leuchtend rot anfärben.

DISKUSSION

In unseren Untersuchungen konnte innerhalb der 3-Tages-Gruppe bei den Tieren, denen EPC und EPO injiziert wurden ein signifikant prozentual höherer Anteil an Makrophagen an der Gesamtzellzahl im Randgebiet festgestellt werden ($p=0,001$).

Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte ein Zusammenhang mit dem antiapoptotischen Effekt sein, den EPO auf Kardiomyozyten ausübt. Es ist nachgewiesen, dass innerhalb des Infarktgebietes nach Ischämie-Reperfusion sowohl nekrotische, als auch apoptotische Zellen vorhanden sind. Verschiedene Studien, die auf Untersuchungen des akuten Myokardinfarktes beruhen haben gezeigt, dass der apoptotische Zelltod in den ersten Stunden der Ischämie dominiert, in späteren Stadien allerdings der nekrotische Zelltod eine größere Rolle spielt (Kajstura et al. 1996).

Das Areal innerhalb des Infarktes, in dem die nekrotischen Zellen überwiegen, wird zunächst massiv von Entzündungszellen, inklusive neutrophilen Granulozyten und Makrophagen infiltriert. Diese Zellen werden progressiv von Granulationsgewebe ersetzt, welches aus Myofibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen besteht und schließlich in Narbengewebe übergeht. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der Phagozytose von nekrotischen Zellen proinflammatorische Mediatoren wie IL-6, IL-8, TNF- α und GM-CSF freigesetzt werden und dadurch eine massive entzündliche Reaktion entsteht (Stern et al. 1996; Cocco and Ucker 2001). Bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen wurde dagegen eine Hemmung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren nachgewiesen (Cocco and Ucker 2001). Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, dass in einem Gebiet, in dem sich sowohl nekrotische, als auch apoptotische Zellen befinden die Gesamtentzündungsreaktion durch die phagozytierten apoptischen Zellen vermindert wird. Wird nun die Gesamtzahl der apoptotischen Zellen gesenkt, so gehen weniger antiinflammatorische Signale von den phagozytierenden Zellen aus und die Rekrutierung der Entzündungszellen, vor allem der Makrophagen, steigt an.

Die Wirkung von EPO auf Zellen nach Ischämie erfolgt über den EPO-Rezeptor. Nach der Dimerisation des Rezeptors kommt es zur Phosphorylation der JAK2, wodurch wiederum verschiedene Signaltransduktionskaskaden über die Aktivierung von PI3-K, Stat5 und MAPKinase erfolgen. Das Resultat der Aktivierung dieser Kaskade ist eine gesteigerte Transkription von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-x Familie. Weiterhin wird die Expression von Apoptosemarkern, wie die Externalisation

DISKUSSION

von Phosphatidylserinresten gehemmt und dadurch die Phagozytose dieser Zellen verhindert (Ghezzi and Brines 2004).

So wäre es möglich, dass eine Verminderung der apoptotischen Zellen durch EPO eine insgesamt stärkere Invasion von Makrophagen in das Infarktgebiet zur Folge hat.

Jedoch könnte die massiv gesteigerte Anzahl von Makrophagen der mit EPO behandelten Tiere auch andere Gründe haben. Haroon et al haben in einer Studie die Rolle von EPO bei der fibrininduzierten Wundheilung untersucht. Hierbei wurden Ratten fibrinogen- und thrombinbeladene Kammern subcutan implantiert, nach sechs Tagen wieder entfernt und mit deren Hilfe die Wundheilung untersucht. Einigen Tieren wurden lokal zusätzlich zwischen 50 und 500 IU/ml EPO injiziert und die Wirkung von EPO auf die Entzündungsreaktion untersucht. In diesem Versuch konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl von Makrophagen im Granulationsgewebe zwischen den Tieren die EPO erhielten und denen welches keines appliziert wurde festgestellt werden (Haroon et al. 2003).

In diesem Zusammenhang betrachtet, könnte die gesteigerte Makrophagenanzahl im Myokardinfarktgebiet auch auf eine Interaktion zwischen EPO und EPCs zurückzuführen sein. So ist nicht ausgeschlossen, dass EPO in der von uns verwendeten Konzentration von 50 IU/ml eventuell eine Schädigung der EPCs verursachen könnte und aus diesem Grund eine gesteigerte intramyokardiale Ansammlung von Makrophagen zur Phagozytose dieser Zellen zu erkennen ist.

4.4 Vergleich der Modelle der transienten Ligatur mit Reperfusion und der permanenten Ligatur der A. paracoronaria sinistra

In vorherigen Studien (Weidl 2007) konnte eine Verbesserung der globalen EF durch alleinige Injektion von endothelialen Progenitorzellen in das Randgebiet des Myokardinfarktes nachgewiesen werden. Dieser Versuch wurde gegen eine Kontrollgruppe, bei der lediglich eine transiente Ligatur der A. paracoronaria sinistra ohne Injektion von Zellen durchgeführt wurde, operiert.

Da in dem vorherigen Versuch über die Wirkung einer zusätzlichen Gabe von Erythropoietin zur Transplantation von EPCs im akuten Myokardinfarkt keine ausreichende Verbesserung der globalen EF, sondern lediglich eine Verbesserung der regionalen Wandbewegung im Zusammenhang mit EPO erreicht werden konnte, wurde dieser Versuch zusätzlich durchgeführt.

Hiermit sollte überprüft werden, ob ein anderes Modell, wie das der permanenten Okklusion der A. paracoronaria sinistra, die myokardiale Funktion so weit verändern könnte, dass in nachfolgenden Studien ein deutlicherer Effekt bei der Verwendung von EPO dargestellt werden könnte.

Da das Ziel dieses Versuches war, die myokardiale Funktion nach 4 Wochen zu beurteilen, haben wir hierbei auf einen Kurzzeitversuch (3-Tages-Tiere) verzichtet.

4.4.1 Ergebnisse in vivo

4.4.1.1 Körpergewicht

Wie auch in dem zuerst durchgeführten Versuch, ist bei diesen Ratten ebenfalls ein Rückgang bzw. eine Stagnation des Körpergewichtes in der ersten Woche nach der Operation zu verzeichnen. Nach ca. sieben Tagen nehmen die Tiere wieder kontinuierlich an Gewicht zu. Diese Entwicklung des Körpergewichtes ist ebenfalls auf den postoperativen Stress und die damit verbundene verminderte Nahrungsaufnahme in den ersten Tagen nach dem Eingriff zurückzuführen.

4.4.1.2 Mortalität

Es ist eine signifikant höhere Mortalität bei den Tieren, bei denen der Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra permanent ligiert wurde zu verzeichnen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Mortalitätsraten. Die Mortalität bei Versuchen mit permanenter Ligatur liegt immer höher als die bei Ischämie/Reperfusionsmodellen ermittelte. So erhielten Beltrami et al bei der Verwendung des Ligaturmodells eine Mortalität von 35%, Ad et al 40% und Leor et al 25% (Ad and Oron 2001; Beltrami et al. 2003; Leor et al. 2006). Bei Versuchen mit dem Ischämie/Reperfusionsmodell ist von Jain et al eine Mortalität von 15% beschrieben (Jain et al. 2001). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde innerhalb früherer Untersuchungen bei Verwendung des Ischämie/Reperfusionsmodells eine durchschnittliche Mortalität von 17,5% ermittelt.

Die deutlich höhere Mortalität der Tiere mit permanenter Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra kann damit erklärt werden, dass durch diese Methode größere Infarkte induziert werden und eine damit zusammenhängende gravierendere Reduktion der linksventrikulären Funktion entsteht. Die Tiere sind deshalb nicht mehr in der Lage, ein solches Insult zu kompensieren und versterben an akutem Herzversagen.

Diese von uns beobachtete hohe Mortalitätsrate bei den Tieren mit Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra stimmt mit der in der Literatur beschriebenen überein. In verschiedenen Studien beträgt die perioperative Mortalität nach Okklusion bis zu 50%, die nach Ischämie/Reperfusion ist als weitaus geringer beschrieben. (Ye et al. 1997; Kompa and Summers 2000).

4.4.1.3 Intraoperative Komplikationen

Die häufigste intraoperative Komplikation ist eine Verletzung der A.thoracica interna, wodurch es zu einer hochgradigen Blutung kommt, die oft letal endet. Diese Blutung trat bei 9,5% der operierten Tiere auf.

Eine weitere Komplikation ist das Kammerflimmern, das bei einem Tier (4,8%) der EPC und EPO-Gruppe zu beobachten ist. Kammerflimmern tritt meist in dem Moment auf, in dem das Myokard durch das Einstechen zum Anbringen der Ligatur manipuliert wird und ist auf die Traumatisierung des Myokards zurückzuführen.

4.4.1.4 Untersuchungen im MRT

4.4.1.4.1 EF und Volumina

Die LVEF beträgt nach vier Wochen bei den Tieren mit Ischämie/Reperfusion im arithmetischen Mittel 49,34% ($\pm 1,92$), bei den Tieren mit Ligatur 32,45% ($\pm 1,9$). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist signifikant ($p=0,0004$). Auf Grund der ebenfalls signifikanten Unterschiede innerhalb der Infarktgröße und des Expansionsindex ist diese Verschlechterung der Auswurfleistung des linken Ventrikels, bedingt durch die vorausgegangene Ischämie und die dadurch verursachte hochgradige Schädigung des Myokards, wie bereits unter 4.3.4.1 diskutiert wurde zu erwarten.

Im Rahmen des LVESV und des LVEDV besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen bezüglich der absoluten Werte, aber im prozentualen Anteil des LVESV am LVEDV ($p=0,002$).

Dieser Unterschied könnte mit der großen Varianz innerhalb der Körpergröße der Ratten zusammenhängen. Je größer die Ratten, desto größer auch die Herzen und desto dicker die Ventrikel. Aus diesem Grund scheint es sinnvoller zu sein, nicht die absoluten Werte in mm, sondern die relativen, prozentualen Werte zu betrachten.

4.4.1.4.2 regionale Wandbewegung

Es konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der regionalen Wandbewegung zwischen den Tieren mit permanenter Okklusion und denen mit transienter Ligatur der LAD nachgewiesen werden.

In der globalen Ejektionsfraktion dagegen konnten signifikante Unterschiede dargestellt werden. Dies kann mit dem Umstand zusammenhängen, dass die regionale Wandbewegung auf Grund der kleinen Gruppengrößen zu große Differenzen aufweist und dadurch keine Signifikanz entstehen kann. Die globale Ejektionsfraktion dagegen stellt einen Summationseffekt der Bewegung der einzelnen Wandabschnitte dar und ergibt dadurch in der Endsumme geringere Differenzen innerhalb der Gruppen, was letztendlich eine Signifikanz entstehen lässt.

4.4.2 Ergebnisse ex vivo

4.4.2.1 Histopathologische Untersuchungen

4.4.2.1.1 Infarktgröße

Die Tiere mit permanenter Ligatur haben signifikant größere Infarkte als die Tiere mit transienter Okklusion der LAD ($p=0,01$).

Es ist schon seit einigen Jahren bekannt, dass eine frühe Reperfusion nach Myokardinfarkt beim Menschen die Infarktgröße reduziert, die Funktion des linken Ventrikels verbessert (Koren et al. 1985; Serruys et al. 1986) und die Mortalität reduziert (Simoons et al. 1985). Bei einer permanenten Ligatur dagegen werden diese Faktoren durch einen deutlicheren Myokardschaden, welcher auf Grund einer hochgradigen Ischämie entsteht verschlechtert. So haben Hochmann et al bereits 1987 festgestellt, dass ein signifikanter Unterschied innerhalb der Infarktgrößen in nach 30 Minuten reperfundiertem Gewebe ($16,8\% \pm 1,9$) und einer permanenten Ligatur ($27\% \pm 2,4$) besteht. Dies stimmt auch mit den von uns erhaltenen Ergebnissen überein. Alle Tiere mit Reperfusion zeigen in unserem Versuch nach vier Wochen außerdem einen intramuralen Infarkt, die mit einer permanenten Ligatur einen transmuralen. Dies wurde auch bereits von Kloner et al nachgewiesen. Bei einem Ischämie-Reperfusions-Modell mit Ischämiephasen von unter 20 Minuten konnten keine Nekrosen des Myokards nachgewiesen werden. Bei Okklusionen über 20 Minuten breitet sich die Nekrose beginnend am Subendokard auf das Subepikard aus. Bei Reperfusionen nach weniger als drei Stunden konnte noch teilweise vitales Myokard nachgewiesen werden, bei Reperfusionen nach über drei Stunden ist eine annähernd transmurale Nekrosezone zu erkennen. Weiterhin ist bei einer Reperfusion nach dieser Zeit kein Unterschied mehr in der muralen Ausbreitung und der Größe des Infarktes im Vergleich zu Tieren mit permanenter Ligatur der LAD zu erkennen (Kloner and Jennings 2001).

4.4.2.1.2 Expansionsindex

Die Ausbreitung des Infarktes vollzieht sich innerhalb der ersten Stunden nach der Ischämie, noch bevor es zu einer extensiven Fibroblastenproliferation und Kollagendeposition, was wiederum zur Narbenbildung führt, kommt (Hochman and Bulkley 1982). Während dieser ersten Stunden ist das infarzierte Myokard besonders anfällig für Schäden, die durch eine Dehnung des Ventrikels entstehen. Ist die Narbe einmal ausgeheilt, stellt sie jedoch ein stabiles Gebilde dar (Parmley et al. 1973). Pfeffer et al behaupten, dass eine Reperfusion, im Gegensatz zu einer permanenten Ligatur, die Deformation während der Infarktheilung limitiert (Pfeffer and Braunwald 1990). Dies stimmt mit den von uns erhaltenen Ergebnissen überein, wobei ein signifikanter Unterschied ($p=0,049$) des Expansionsindexes zwischen den Tieren mit Ischämie/Reperfusion [$36,84\% (\pm 6)$] und den Tieren mit permanenter Ligatur [$134\% (\pm 33)$] festgestellt werden konnte.

4.4.2.1.3 Aktin

Innerhalb der Anzahl von kleinen und mittelgroßen Gefäßen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Jedoch zeigten die Tiere, bei denen das Reperfusionsmodell verwendet wurde einen signifikant höheren Anteil an großen Gefäßen ($p<0,05$) und einen signifikant höheren prozentualen Anzahl von Gefäßen an der Gesamtzahl der Zellen im Randgebiet ($p<0,05$).

Dies ist damit zu erklären, dass es nach einem Reperfusionsschaden, im Gegensatz zu dem durch die permanente Ligatur verursachten Schaden des Myokards, eine deutlichere Entzündungsreaktion zu verzeichnen ist. So kommt es hierbei zu einer stärkeren (sowohl in der Intensität, als auch in deren Ausbreitung) Infiltration von mononukleären Zellen (Frangogiannis et al. 2002). Da bei jeder Entzündungsreaktion angiogene Faktoren freigesetzt werden und nach einer Reperfusion eine deutlichere Entzündungsreaktion zu verzeichnen ist, ist der langfristig höhere Anteil an Gefäßen bei dem Reperfusionsmodell zu erwarten.

Weiterhin ist dies durch die geringere Gewebsschädigung nach einer Reperfusion im Gegensatz zu der hochgradigen Schädigung nach einer permanenten Okklusion der A. coronaria sinistra zu erklären. So sind Kardiomyozyten in der Lage, kurze,

DISKUSSION

vorübergehende Ischämiephasen zu tolerieren. Auch wenn diese Ischämie keinen Zelltod zur Folge hat, führt sie zu einer Schädigung der Myozyten. Im Hundeherz führt eine totale Okklusion der Koronararterie innerhalb einer Dauer von 15 Minuten zu reversiblen, eine Okklusion über einen längeren Zeitraum zu irreversiblen Schäden am Myokard (Kloner et al. 1974; Jennings et al. 1990). Diese hochgradige Schädigung resultiert in einem nekrotischen Gewebsareal, in dem eine Neubildung von Gefäßen kaum möglich ist. Aus diesem Grund ist die bessere Gefäßneubildung innerhalb der Reperfusionsgruppe zu erwarten.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die von uns injizierte Menge und die Art der Injektion von EPCs kombiniert mit EPO eine sichtbare Auswirkung auf das Remodeling nach Myokardinfarkt hat. Leider konnten nach vier Wochen weder eine Verbesserung der myokardialen Funktion und der Hämodynamik, noch eine Abnahme der Infarktgröße festgestellt werden. Da sich aber eine signifikante Gefäßneubildung zeigt und die vermehrte Rekrutierung von Makrophagen am wahrscheinlichsten über den antiapoptotischen Effekt von EPO erklärt werden kann, sind in Zukunft auf diesem Gebiet noch weitere Untersuchungen durchzuführen. So wäre eine dritte Messung der Funktionsparameter zu einem späteren Zeitpunkt sehr interessant, da sich bis dahin die Neoangiogenese doch noch positiv auf die Regeneration des Gewebes nach Myokardinfarkt und die Ventrikelfunktion auswirken könnte. Weiterhin sollten verschiedenen Konzentrationen von EPO kombiniert mit EPCs, bei ebenfalls intramyokardialer Injektion verglichen werden. Die Injektion von EPO ohne EPCs wäre im Vergleich zu den Gruppen, die EPCs erhielten auch interessant.

Durch unsere Ergebnisse zeigen wir, dass die Therapie von Ratten nach Myokardinfarkt mit EPCs vermischt mit EPO positive Ansätze zeigt, jedoch sind noch weitere Versuche notwendig um noch effektivere Ergebnisse zu erhalten.

Im zweiten Versuch, in dem wir das Okklusionsmodell mit dem Modell der Reperfusion nach 30 Minuten verglichen haben, hat sich, wie zu erwarten war, ein signifikanter Unterschied der LVEF, des prozentualen Anteil des LVESV am LVEDV, der Infarktgröße und des Expansionsindexes herausgestellt. Leider konnte nur ein annähernd signifikanter Unterschied innerhalb der lokalen Wandbewegung zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dies könnte mit der Tatsache zusammenhängen, dass bei diesen Werten jeweils absolute, bei den erst genannten Werten jeweils relative Werte angegeben werden. Da die Körpergröße der Ratten zum Zeitpunkt der Untersuchung in diesem Versuch zwischen 286,6g und 380g schwankt, zieht dies auch eine gravierende Differenz in den Wanddicken der Ventrikel, so wie in den LVEDV und LVESV mit sich.

DISKUSSION

In weiteren Versuchen sollten trotz erschwerter OP-Bedingungen bei adulten Tieren ausgewachsene Ratten verwendet werden, um die Ergebnisse besser vergleichen zu können.

5. Zusammenfassung

„Lokale Applikation von Erythropoietin und endothelialen Progenitorzellen zur Regeneration des experimentellen Myokardinfarktes der Nacktratte“

Hintergrund: In tierexperimentellen Untersuchungen führt die Applikation von expandierten endothelialen Progenitorzellen (EPC) nach Myokardinfarkt durch eine Steigerung der Vaskulogenese und parakrine Effekte zu einer Verbesserung der linksventrikulären systolischen Funktion. Auf Grund seiner antiapoptotischen und kardioprotektiven Effekte könnte Erythropoietin beta (EPO) eine zusätzliche Verbesserung der myokardialen Funktion im experimentellen Myokardinfarkt bewirken.

Methoden: Bei insgesamt 24 Nacktratten wurde nach Throakotomie durch Ligatur des Ramus interventricularis paraconalis der A. coronaria sinistra für 30 Minuten ein Myokardinfarkt induziert, mit anschließender Reperfusion durch Eröffnen der Ligatur. In das Infarkttrandgebiet wurden 10^6 EPC /150 μ l mit 0,15x50 IU Erythropoietin oder nur in Pufferlösung injiziert. Die EPCs wurden nach Expansion aus isolierten CD34+ Nabelschnurblutzellen und Expansion in endotheliale Medium über 4-6 Passagen gewonnen. Nach 4 Wochen wurde die globale und regionale linksventrikuläre Funktion im Zwei- und Vierkammerblick mittels Kernspintomographie (MRT) gemessen. Die Infarktgröße wurde nach Masson-Trichrom Färbung planimetrisch ausgemessen und die Gefäßdichte nach Anfärbung mit Antikörpern gegen glattes Muskelzellaktin quantifiziert. Um die Entzündungsreaktion im akuten Myokardinfarkt zu untersuchen wurden 10 weitere Tiere bereits nach 3 Tagen geopfert und der Anteil von CD68+ monozytären Zellen im Infarkttrandgebiet bestimmt.

Ergebnisse: EPO zeigte keinen Effekt auf die Infarktgröße (18,6 \pm 2,3 gegenüber 24,7 \pm 3,6 nur mit eEPC). Bei den Tieren, die zusätzlich EPO erhielten, zeigte sich jedoch eine signifikant größere Anzahl infiltrierender CD68+ Zellen im Infarkttrandgebiet nach 3 Tagen (66,2 \pm 4,5 gegenüber 38,6 \pm 0,6% nur mit EPCs, $p=0.004$). Nach 4 Wochen war die Anzahl der Gefäße in dem Infarkttrandgebiet signifikant erhöht (6,5 \pm 1,1% gegenüber 3,6 \pm 0,3% nur mit EPCs). Hinsichtlich der globalen LV-Funktion im MRT bestand kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die regionale Wandbewegung im anterolateralen Infarktgebiet jedoch war in der Gruppe die Erythropoietin erhielt signifikant besser. Schlussfolgerung:

ZUSAMMENFASSUNG

Die Zugabe von Erythropoetin zu EPCs, die im experimentellen Myokardinfarkt intramyokardial verabreicht werden steigert die initiale Infiltration CD68+ monozytärer Zellen und die Gefäßneubildung nach 4 Wochen. Dies könnte zu einer Verbesserung der regionalen Wandbewegung, die sich im MRT zeigte, beitragen. Inwieweit antiapoptotische oder proangiogenetische Effekte des Erythropoetins dazu beitragen erfordert weitere Untersuchungen.

SUMMARY

6. Summary

„Local application of Erythropoietin and endothelial progenitor cells for regeneration in experimental myocardial infarction of nude rats”

Background: Experimental studies showed that application of expanded endothelial progenitor cells (EPCs) after myocardial infarction improves left ventricular function by enhancing vasculogenesis and by paracrine effects. Erythropoietin beta (EPO) could further improve myocardial function after experimental myocardial infarction by anti apoptotic and cardioprotective effects.

Methods: Acute myocardial ischemia was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery of 24 male athymic nude rats and reperfusion was initiated after 30 minutes. Either 1×10^6 EPCs alone (n=12) or EPCs and 0,15x50 IU Erythropoietin beta (n=12) were injected intramyocardially into the border zone of the ischemic area. EPC were attained by expanding CD34+ cells isolated from cord blood in endothelial medium for 6-10 passages. After 4 weeks global and regional left ventricular function was measured by MRI in 2-chamber and 4-chamber long-axis series. Infarct area was determined planimetrically in masson's trichrome stained histologic sections and vessel density was quantified after immuno-histologic staining for smooth muscle cell actin. To analyse early inflammation 10 further rats were immolated three days after myocardial infarction and CD68+ mononuclear cells were quantified in the border zone of the ischemic area.

Results: The additional application of erythropoietin showed no affect on size of infarct area (18.6 + 2.3% versus 24.7 + 3.6% EPC alone). The number of CD68+ mononuclear cells was significantly higher in rats that were treated with EPC and EPO (66.2 + 4.5% versus 38.6+0.6%, p=0.004) and after 4 weeks vessel density was significant higher (6.5+1.1% versus 3.6+0.3% eEPC alone). Global left ventricular function did not differ in both groups. Regional wall movement of the antero-lateral segments was significantly improved in rats which obtained EPO. Erythropoietin showed a dose dependent reduction of apoptotic leukocytes in vitro.

Conclusion: Intramyocardial application of erythropoietin beta additionally to EPC after experimental myocardial infarction in rats enhances initial

SUMMARY

infiltration of CD68+ mononuclear cells and vessel density after 4 weeks. This could contribute to the MRI measured improved regional wall movement. To clarify if these effects are due to anti apoptotic and proangiogenic effects of erythropoietin further studies have to be performed

7. Literaturverzeichnis

- Ad, N. and U. Oron (2001). "Impact of low level laser irradiation on infarct size in the rat following myocardial infarction." Int J Cardiol **80**(2-3): 109-16.
- Anagnostou, A., E. S. Lee, et al. (1990). "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5978-82.
- Anagnostou, A., Z. Liu, et al. (1994). "Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3974-8.
- Anversa, P., C. Beghi, et al. (1986). "Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth." Circ Res **58**(1): 26-37.
- Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Asahara, T., T. Takahashi, et al. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Embo J **18**(14): 3964-72.
- Ashley, R. A., S. H. Dubuque, et al. (2002). "Erythropoietin stimulates vasculogenesis in neonatal rat mesenteric microvascular endothelial cells." Pediatr Res **51**(4): 472-8.
- Assandri, R., M. Egger, et al. (1999). "Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line." J Physiol **516** (Pt 2): 343-52.
- Bagnard, D., N. Sainturet, et al. (2004). "Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells." Mol Cell Neurosci **25**(4): 722-31.
- Bahlmann, F. H., K. De Groot, et al. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." Blood **103**(3): 921-6.
- Banai, S., D. Shweiki, et al. (1994). "Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis." Cardiovasc Res **28**(8): 1176-9.
- Beck, I., R. Weinmann, et al. (1993). "Characterization of hypoxia-responsive enhancer in the human erythropoietin gene shows presence of hypoxia-inducible 120-Kd nuclear DNA-binding protein in erythropoietin-producing and nonproducing cells." Blood **82**(3): 704-11.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, et al. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." Cell **114**(6): 763-76.
- Besarab, A., W. K. Bolton, et al. (1998). "The effects of normal as compared with low hematocrit values in patients with cardiac disease who are receiving hemodialysis and epoetin." N Engl J Med **339**(9): 584-90.
- Bialik, S., V. L. Cryns, et al. (1999). "The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes." Circ Res **85**(5): 403-14.
- Bode, J. (2007). "Jak/STAT Signalvermittlung." Webseite der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.
- Bonsdorff E, J. E. (1948). "A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis." Acta Physiol Scand **16**: 150-170.
- Braunwald, E. and R. A. Kloner (1982). "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction." Circulation **66**(6): 1146-9.

LITERATURVERZEICHNIS

- Braunwald, E. and R. A. Kloner (1985). "Myocardial reperfusion: a double-edged sword?" J Clin Invest **76**(5): 1713-9.
- Broudy, V. C., N. Lin, et al. (1991). "Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells." Blood **77**(12): 2583-90.
- Brown, E. J., Jr., R. A. Kloner, et al. (1983). "Scar thinning due to ibuprofen administration after experimental myocardial infarction." Am J Cardiol **51**(5): 877-83.
- Bunn, H. F., J. Gu, et al. (1998). "Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation." J Exp Biol **201**(Pt 8): 1197-201.
- Cai, J., J. Yang, et al. (1998). "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c." Biochim Biophys Acta **1366**(1-2): 139-49.
- Cai, Z. and G. L. Semenza (2004). "Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury." Circulation **109**(17): 2050-3.
- Calvillo, L., R. Latini, et al. (2003). "Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4802-6.
- Campana, W. M. and R. R. Myers (2003). "Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury." Eur J Neurosci **18**(6): 1497-506.
- Cao, J., M. M. Semenova, et al. (2004). "Distinct requirements for p38alpha and c-Jun N-terminal kinase stress-activated protein kinases in different forms of apoptotic neuronal death." J Biol Chem **279**(34): 35903-13.
- Carlini, R. G., A. A. Reyes, et al. (1995). "Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro." Kidney Int **47**(3): 740-5.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Carnot P, D. C. (1906). "Sur l'activité hemopoietique du serum au cours de la regeneration du sang." C R Acad Sci (Paris) **143**: 384-386.
- Cerqueira, M. D., N. J. Weissman, et al. (2002). "Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association." Circulation **105**(4): 539-42.
- Chimenti, S., E. Carlo, et al. (2004). "Myocardial infarction: animal models." Methods Mol Med **98**: 217-26.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2002). "Angiogenesis and plasticity: role of erythropoietin in vascular systems." J Hematother Stem Cell Res **11**(6): 863-71.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2002). "Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases." Circulation **106**(23): 2973-9.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2003). "Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin." J Cereb Blood Flow Metab **23**(3): 320-30.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2003). "Erythropoietin: cytoprotection in vascular and neuronal cells." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **3**(2): 141-54.
- Chong, Z. Z., S. H. Lin, et al. (2003). "Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8." J Neurosci Res **71**(5): 659-69.

LITERATURVERZEICHNIS

- Cocco, R. E. and D. S. Ucker (2001). "Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure." Mol Biol Cell **12**(4): 919-30.
- Constantinescu, S. N., T. Keren, et al. (2001). "Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4379-84.
- Crivellato, E., B. Nico, et al. (2004). "Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo." Leukemia **18**(2): 331-6.
- Cross, T. G., D. Scheel-Toellner, et al. (2000). "Serine/threonine protein kinases and apoptosis." Exp Cell Res **256**(1): 34-41.
- D'Andrea, A. D. and L. I. Zon (1990). "Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation." J Clin Invest **86**(3): 681-7.
- Davis, L. E., J. A. Widness, et al. (2003). "Renal and placental secretion of erythropoietin during anemia or hypoxia in the ovine fetus." Am J Obstet Gynecol **189**(6): 1764-70.
- Deacon, E. M., J. Pongracz, et al. (1997). "Isoenzymes of protein kinase C: differential involvement in apoptosis and pathogenesis." Mol Pathol **50**(3): 124-31.
- Deten, A., H. C. Volz, et al. (2002). "Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats." Cardiovasc Res **55**(2): 329-40.
- Dewald, O., G. Ren, et al. (2004). "Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction." Am J Pathol **164**(2): 665-77.
- Eaton, L. W. and B. H. Bulkley (1981). "Expansion of acute myocardial infarction: its relationship to infarct morphology in a canine model." Circ Res **49**(1): 80-8.
- Eguchi, M., H. Masuda, et al. (2007). "Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis." Clin Exp Nephrol **11**(1): 18-25.
- Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, et al. (2002). "Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial." Mol Med **8**(8): 495-505.
- Erlebacher, J. A., J. L. Weiss, et al. (1982). "Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study." Am J Cardiol **49**(5): 1120-6.
- Fadok, V. A., A. de Cathelineau, et al. (2001). "Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts." J Biol Chem **276**(2): 1071-7.
- Fisher, J. W. (2003). "Erythropoietin: physiology and pharmacology update." Exp Biol Med (Maywood) **228**(1): 1-14.
- Flamme, I. and W. Risau (1992). "Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro." Development **116**(2): 435-9.
- Fleet, W. F., T. A. Johnson, et al. (1985). "Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K⁺, pH, and activation in the pig." Circulation **72**(4): 922-32.
- Fletcher, P. J., J. M. Pfeffer, et al. (1981). "Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function." Circ Res **49**(3): 618-26.
- Fliser, D., F. H. Bahlmann, et al. (2006). "Mechanisms of disease: erythropoietin--an old hormone with a new mission?" Nat Clin Pract Cardiovasc Med **3**(10): 563-72.
- Frangogiannis, N. G., C. W. Smith, et al. (2002). "The inflammatory response in myocardial infarction." Cardiovasc Res **53**(1): 31-47.

LITERATURVERZEICHNIS

- Fuste, B., M. Serradell, et al. (2002). "Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro." Thromb Haemost **88**(4): 678-85.
- Gawehn, S. (2005). Dissertation.
- Genc, S., T. F. Koroglu, et al. (2004). "Erythropoietin as a novel neuroprotectant." Restor Neurol Neurosci **22**(2): 105-19.
- George, J., E. Goldstein, et al. (2004). "Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation." Eur Heart J **25**(12): 1003-8.
- Ghezzi, P. and M. Brines (2004). "Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine." Cell Death Differ **11 Suppl 1**: S37-44.
- Gill, M., S. Dias, et al. (2001). "Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells." Circ Res **88**(2): 167-74.
- Goldberg, N., A. P. Lundin, et al. (1992). "Changes in left ventricular size, wall thickness, and function in anemic patients treated with recombinant human erythropoietin." Am Heart J **124**(2): 424-7.
- Green, D. R. and J. C. Reed (1998). "Mitochondria and apoptosis." Science **281**(5381): 1309-12.
- Gregory, C. J. and A. C. Eaves (1978). "Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties." Blood **51**(3): 527-37.
- Grimm, C., A. Wenzel, et al. (2002). "HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration." Nat Med **8**(7): 718-24.
- Gulati, R., D. Jevremovic, et al. (2003). "Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood." Circ Res **93**(11): 1023-5.
- Hambrecht, R., E. Fiehn, et al. (1998). "Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure." Circulation **98**(24): 2709-15.
- Hammerman, H., R. A. Kloner, et al. (1983). "Dose-dependent effects of short-term methylprednisolone on myocardial infarct extent, scar formation, and ventricular function." Circulation **68**(2): 446-52.
- Hammerman, H., F. J. Schoen, et al. (1984). "Drug-induced expansion of infarct: morphologic and functional correlations." Circulation **69**(3): 611-7.
- Hansen, P. R. (1995). "Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion." Circulation **91**(6): 1872-85.
- Haroon, Z. A., K. Amin, et al. (2003). "A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response." Am J Pathol **163**(3): 993-1000.
- Hassan, K., B. Gross, et al. (2004). "The presence of erythropoietin receptors in the human peripheral nervous system." Clin Nephrol **61**(2): 127-9.
- Hazirolan, T., B. Tasbas, et al. (2007). "Comparison of short and long axis methods in cardiac MR imaging and echocardiography for left ventricular function." Diagn Interv Radiol **13**(1): 33-8.
- Heeschen, C., A. Aicher, et al. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." Blood **102**(4): 1340-6.
- Hewitson, K. S., L. A. McNeill, et al. (2004). "Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer." Curr Pharm Des **10**(8): 821-33.
- Hildebrandt (1998). Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch. Berlin, New York.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hill, J. M., G. Zalos, et al. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." N Engl J Med **348**(7): 593-600.
- Hirata, A., T. Minamino, et al. (2006). "Erythropoietin enhances neovascularization of ischemic myocardium and improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in dogs." J Am Coll Cardiol **48**(1): 176-84.
- Hirata, Y., K. Umemura, et al. (1995). "An experimental myocardial infarction model in the rat and its properties." Jpn J Pharmacol **67**(1): 51-7.
- Hochman, J. S. and B. H. Bulkley (1982). "Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study." Circulation **65**(7): 1446-50.
- Hoffman, M. (1991). "A new role for gases: neurotransmission." Science **252**(5014): 1788.
- Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, et al. (2001). "Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells." J Cell Biol **155**(4): 649-59.
- Hornig, B., V. Maier, et al. (1996). "Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure." Circulation **93**(2): 210-4.
- Hoshida, S., T. Kuzuya, et al. (1993). "Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart." Am J Physiol **264**(1 Pt 2): H33-9.
- Hur, J., C. H. Yoon, et al. (2004). "Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 288-93.
- Imai, N., A. Kawamura, et al. (1990). "Physicochemical and biological comparison of recombinant human erythropoietin with human urinary erythropoietin." J Biochem (Tokyo) **107**(3): 352-9.
- Jacobs-Helber, S. M., J. J. Ryan, et al. (2000). "JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following EPO withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells." Blood **96**(3): 933-40.
- Jain, M., H. DerSimonian, et al. (2001). "Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction." Circulation **103**(14): 1920-7.
- Jennings, R. B., C. Murry, et al. (1990). "Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion." Adv Cardiol **37**: 7-31.
- Jennings, R. B., C. E. Murry, et al. (1990). "Development of cell injury in sustained acute ischemia." Circulation **82**(3 Suppl): II2-12.
- Jennings, R. B., K. A. Reimer, et al. (1986). "Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion." J Mol Cell Cardiol **18**(8): 769-80.
- Jennings, R. B., J. Schaper, et al. (1985). "Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure." Circ Res **56**(2): 262-78.
- Jennings, R. B., L. Sebbag, et al. (2001). "Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection." J Mol Cell Cardiol **33**(9): 1571-88.
- Jennings, R. B. and C. Steenbergen, Jr. (1985). "Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia." Annu Rev Physiol **47**: 727-49.
- Johns, T. N. and B. J. Olson (1954). "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals." Ann Surg **140**(5): 675-82.
- Jugdutt, B. I. (1985). "Delayed effects of early infarct-limiting therapies on healing after myocardial infarction." Circulation **72**(4): 907-14.

LITERATURVERZEICHNIS

- Juul, S. E., A. T. Yachnis, et al. (1998). "Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus." Early Hum Dev **52**(3): 235-49.
- Kajstura, J., W. Cheng, et al. (1996). "Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats." Lab Invest **74**(1): 86-107.
- Kalka, C., H. Masuda, et al. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3422-7.
- Kamihata, H., H. Matsubara, et al. (2001). "Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines." Circulation **104**(9): 1046-52.
- Kang, J. Q., Z. Z. Chong, et al. (2003). "Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation." Mol Pharmacol **64**(3): 557-69.
- Katritsis DG, S. P., Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, Voridis EM, Papamichail M. (2005). "Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium." Catheter Cardiovasc Interv. **65**(3): 321-9.
- Kaushal, S., G. E. Amiel, et al. (2001). "Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo." Nat Med **7**(9): 1035-40.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, et al. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation **103**(5): 634-7.
- Kawamoto, A., T. Tkebuchava, et al. (2003). "Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia." Circulation **107**(3): 461-8.
- Kertesz, N., J. Wu, et al. (2004). "The role of erythropoietin in regulating angiogenesis." Dev Biol **276**(1): 101-10.
- Kloner, R. A., C. E. Ganote, et al. (1974). "Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow." Am J Pathol **74**(3): 399-422.
- Kloner, R. A. and R. B. Jennings (2001). "Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2." Circulation **104**(25): 3158-67.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, et al. (1997). "The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis." Science **275**(5303): 1132-6.
- Kocher, A. A., M. D. Schuster, et al. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." Nat Med **7**(4): 430-6.
- Kompa, A. R. and R. J. Summers (2000). "Lidocaine and surgical modification reduces mortality in a rat model of cardiac failure induced by coronary artery ligation." J Pharmacol Toxicol Methods **43**(3): 199-203.
- Kondo, T., M. Hayashi, et al. (2004). "Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1442-7.

LITERATURVERZEICHNIS

- Koren, G., A. T. Weiss, et al. (1985). "Prevention of myocardial damage in acute myocardial ischemia by early treatment with intravenous streptokinase." N Engl J Med **313**(22): 1384-9.
- Koshimura, K., Y. Murakami, et al. (1999). "Effects of erythropoietin on neuronal activity." J Neurochem **72**(6): 2565-72.
- Koury, M. J. and M. C. Bondurant (1990). "Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells." Science **248**(4953): 378-81.
- Krantz, S. B. (1991). "Erythropoietin." Blood **77**(3): 419-34.
- Krause, K. T., K. Jaquet, et al. (2006). "Percutaneous endocardial injection of erythropoietin: assessment of cardioprotection by electromechanical mapping." Eur J Heart Fail **8**(5): 443-50.
- Kubatzky, K. F., W. Ruan, et al. (2001). "Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor." Curr Biol **11**(2): 110-5.
- Laufs, U., N. Werner, et al. (2004). "Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis." Circulation **109**(2): 220-6.
- Leor, J., L. Rozen, et al. (2006). "Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart." Circulation **114**(1 Suppl): I94-100.
- Lin, C. S., S. K. Lim, et al. (1996). "Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis." Genes Dev **10**(2): 154-64.
- Liu, X., W. Xie, et al. (2006). "Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion." Life Sci **78**(19): 2255-64.
- Llavadot, J., S. Murasawa, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells." J Clin Invest **108**(3): 399-405.
- Loomans, C. J., E. J. de Koning, et al. (2004). "Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes." Diabetes **53**(1): 195-9.
- Low-Friedrich, I., P. Grutzmacher, et al. (1991). "Therapy with recombinant human erythropoietin reduces cardiac size and improves heart function in chronic hemodialysis patients." Am J Nephrol **11**(1): 54-60.
- Lutgens, E., M. J. Daemen, et al. (1999). "Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes." Cardiovasc Res **41**(3): 586-93.
- Machnik, M., Bialas B, Schänzer W (2002). "Der direkte Nachweis von rekombinantem Erythropoietin (rEPO) in Urin." Webseite des Institutes für Biochemie, DSHS Köln.
- Maiese, K., F. Li, et al. (2004). "Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled?" Trends Pharmacol Sci **25**(11): 577-83.
- Maiese, K. and A. M. Vincent (2000). "Membrane asymmetry and DNA degradation: functionally distinct determinants of neuronal programmed cell death." J Neurosci Res **59**(4): 568-80.
- Majno, G. and I. Joris (1995). "Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death." Am J Pathol **146**(1): 3-15.

LITERATURVERZEICHNIS

- Marber, M. S., D. S. Latchman, et al. (1993). "Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction." Circulation **88**(3): 1264-72.
- Marti, A., B. Jehn, et al. (1994). "Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells." Oncogene **9**(4): 1213-23.
- Martinez-Estrada, O. M., E. Rodriguez-Millan, et al. (2003). "Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability." Eur J Neurosci **18**(9): 2538-44.
- Martorana, P. A., B. Kettenbach, et al. (1990). "Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist." Eur J Pharmacol **182**(2): 395-6.
- Masuda, H. and T. Asahara (2003). "Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration." Cardiovasc Res **58**(2): 390-8.
- Masuda, S., T. Kobayashi, et al. (2000). "The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner." Am J Physiol Endocrinol Metab **278**(6): E1038-44.
- Masuda, S., M. Nagao, et al. (1993). "Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells." J Biol Chem **268**(15): 11208-16.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.
- Mayani, H. and P. M. Lansdorp (1994). "Thy-1 expression is linked to functional properties of primitive hematopoietic progenitor cells from human umbilical cord blood." Blood **83**(9): 2410-7.
- Meizlish, J. L., H. J. Berger, et al. (1984). "Functional left ventricular aneurysm formation after acute anterior transmural myocardial infarction. Incidence, natural history, and prognostic implications." N Engl J Med **311**(16): 1001-6.
- Michael, L. H., M. L. Entman, et al. (1995). "Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model." Am J Physiol **269**(6 Pt 2): H2147-54.
- Mill, J. G., I. Stefanon, et al. (1990). "Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats." Cardiovasc Res **24**(9): 748-53.
- Miura, O., A. D'Andrea, et al. (1991). "Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis." Mol Cell Biol **11**(10): 4895-902.
- Miyake, T., C. K. Kung, et al. (1977). "Purification of human erythropoietin." J Biol Chem **252**(15): 5558-64.
- Mladenovic, J. and N. E. Kay (1988). "Erythropoietin induces rapid increases in intracellular free calcium in human bone marrow cells." J Lab Clin Med **112**(1): 23-7.
- Moon, C., M. Krawczyk, et al. (2003). "Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11612-7.
- Morishita, E., S. Masuda, et al. (1997). "Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death." Neuroscience **76**(1): 105-16.
- Mujais, S. K., N. Beru, et al. (1999). "Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney." Cell Biochem Biophys **30**(1): 153-66.

LITERATURVERZEICHNIS

- Muller-Ehmsen, J., A. Schmidt, et al. (2006). "Role of erythropoietin for angiogenesis and vasculogenesis: from embryonic development through adulthood." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(1): H331-340.
- Murohara, T. (2001). "Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors." Trends Cardiovasc Med **11**(8): 303-7.
- Murohara, T., H. Ikeda, et al. (2000). "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization." J Clin Invest **105**(11): 1527-36.
- Nagai, A., E. Nakagawa, et al. (2001). "Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture." J Neuropathol Exp Neurol **60**(4): 386-92.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-65.
- Natori, T., M. Sata, et al. (2002). "G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Biochem Biophys Res Commun **297**(4): 1058-61.
- Neuss, M., M. T. Crow, et al. (2001). "Apoptosis in cardiac disease--what is it--how does it occur." Cardiovasc Drugs Ther **15**(6): 507-23.
- O'Shea, J. D., M. F. Hay, et al. (1978). "Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep." J Reprod Fertil **54**(1): 183-7.
- Orlic, D., J. M. Hill, et al. (2002). "Stem cells for myocardial regeneration." Circ Res **91**(12): 1092-102.
- Ott, I., U. Keller, et al. (2005). "Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction." Faseb J **19**(8): 992-4.
- Parmley, W. W., L. Chuck, et al. (1973). "In vitro length-tension relations of human ventricular aneurysms. Relation of stiffness to mechanical disadvantage." Am J Cardiol **32**(7): 889-94.
- Parsa, C. J., J. Kim, et al. (2004). "Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts." J Biol Chem **279**(20): 20655-62.
- Parsa, C. J., A. Matsumoto, et al. (2003). "A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart." J Clin Invest **112**(7): 999-1007.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-8.
- Pfeffer, J. M., M. A. Pfeffer, et al. (1991). "Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction." Am J Physiol **260**(5 Pt 2): H1406-14.
- Pfeffer, M. A. and E. Braunwald (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." Circulation **81**(4): 1161-72.
- Pfeffer, M. A., J. M. Pfeffer, et al. (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." Circ Res **44**(4): 503-12.
- Philo, J. S., K. H. Aoki, et al. (1996). "Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction." Biochemistry **35**(5): 1681-91.
- Rafii, S. (2000). "Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise." J Clin Invest **105**(1): 17-9.
- Rafii, S. and D. Lyden (2003). "Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration." Nat Med **9**(6): 702-12.

LITERATURVERZEICHNIS

- Rehman, J., J. Li, et al. (2004). "Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells." J Am Coll Cardiol **43**(12): 2314-8.
- Remy, I., I. A. Wilson, et al. (1999). "Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change." Science **283**(5404): 990-3.
- Ribatti, D., M. Presta, et al. (1999). "Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo." Blood **93**(8): 2627-36.
- Riede, U.-N. (1998). Taschenatlas der allgemeinen Pathologie.
- Riesau (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**: 671-74.
- Risau, W. (1995). "Differentiation of endothelium." Faseb J **9**(10): 926-33.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **11**: 73-91.
- Risau, W., H. Sariola, et al. (1988). "Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies." Development **102**(3): 471-8.
- Rosamond, F., Furie, Go, Greenlund et al (2007). "Heart Disease and Stroke Statistics 2008 Update." Circulation.
- Rosler, O. G., K. M. Giehl, et al. (2004). "Neuroprotection of immortalized hippocampal neurones by brain-derived neurotrophic factor and Raf-1 protein kinase: role of extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase." J Neurochem **88**(5): 1240-52.
- Rovetto, M. J., W. F. Lamberton, et al. (1975). "Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts." Circ Res **37**(6): 742-51.
- Sack, M. N., R. M. Smith, et al. (2000). "Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia--an anti-apoptotic perspective." Cardiovasc Res **45**(3): 688-95.
- Sasaki, H., B. Bothner, et al. (1987). "Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA." J Biol Chem **262**(25): 12059-76.
- Sasaki, R. (2003). "Pleiotropic functions of erythropoietin." Intern Med **42**(2): 142-9.
- Sasaki, R., S. Masuda, et al. (2000). "Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis." Biosci Biotechnol Biochem **64**(9): 1775-93.
- Sawada, K., S. B. Krantz, et al. (1990). "Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors." J Cell Physiol **142**(2): 219-30.
- Sawyer, S. T., S. B. Krantz, et al. (1987). "Identification of the receptor for erythropoietin by cross-linking to Friend virus-infected erythroid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(11): 3690-4.
- Schatteman, G. C., H. D. Hanlon, et al. (2000). "Blood-derived angioblasts accelerate blood-flow restoration in diabetic mice." J Clin Invest **106**(4): 571-8.
- Schömig K, B. G., Birgit Steppich, Domonik Sepp, Jan Kaufmann, Andreas Stein, Albert Schömig, Ilka Ott (2006). "Interleukin-8 is associated with circulating CD133+ progenitor cells in acute myocardial infarction." Eur Heart J **27**: 1032-1037.
- Schultz, J. E., E. Rose, et al. (1995). "Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts." Am J Physiol **268**(5 Pt 2): H2157-61.
- Selye, H., E. Bajusz, et al. (1960). "Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat." Angiology **11**: 398-407.
- Serruys, P. W., M. L. Simoons, et al. (1986). "Preservation of global and regional left ventricular function after early thrombolysis in acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **7**(4): 729-42.

LITERATURVERZEICHNIS

- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction." Circulation **103**(23): 2776-9.
- Shintani, S., T. Murohara, et al. (2001). "Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation." Circulation **103**(6): 897-903.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-5.
- Silverberg, D. S., D. Wexler, et al. (2001). "The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study." J Am Coll Cardiol **37**(7): 1775-80.
- Simoons, M. L., P. W. Serruys, et al. (1985). "Improved survival after early thrombolysis in acute myocardial infarction. A randomised trial by the Interuniversity Cardiology Institute in The Netherlands." Lancet **2**(8455): 578-82.
- Simpson, P. J., J. K. Mickelson, et al. (1987). "Free radical scavengers in myocardial ischemia." Fed Proc **46**(7): 2413-21.
- Smadja, D. M., A. Cornet, et al. (2007). "Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy." Cell Biol Toxicol **23**(4): 223-39.
- Spadaro, J., M. C. Fishbein, et al. (1980). "Characterization of myocardial infarcts in the rat." Arch Pathol Lab Med **104**(4): 179-83.
- Steenbergen, C., E. Murphy, et al. (1987). "Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart." Circ Res **60**(5): 700-7.
- Stern, M., J. Savill, et al. (1996). "Human monocyte-derived macrophage phagocytosis of senescent eosinophils undergoing apoptosis. Mediation by alpha v beta 3/CD36/thrombospondin recognition mechanism and lack of phlogistic response." Am J Pathol **149**(3): 911-21.
- Stohlawetz, P. J., L. Dzirlo, et al. (2000). "Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans." Blood **95**(9): 2983-9.
- Strehlow, K., N. Werner, et al. (2003). "Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation." Circulation **107**(24): 3059-65.
- Susin, S. A., N. Zamzami, et al. (1996). "Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease." J Exp Med **184**(4): 1331-41.
- Suzuki, M., T. Tetsuka, et al. (2000). "The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts." FEBS Lett **465**(1): 23-7.
- Taguchi, A., T. Soma, et al. (2004). "Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model." J Clin Invest **114**(3): 330-8.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-8.
- Tarnavski, O., J. R. McMullen, et al. (2004). "Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies." Physiol Genomics **16**(3): 349-60.

LITERATURVERZEICHNIS

- Tepper, O. M., R. D. Galiano, et al. (2002). "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." Circulation **106**(22): 2781-6.
- Tramontano, A. F., R. Muniyappa, et al. (2003). "Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway." Biochem Biophys Res Commun **308**(4): 990-4.
- Tsuda, E., M. Goto, et al. (1988). "Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins." Biochemistry **27**(15): 5646-54.
- Urbanek, K., D. Torella, et al. (2005). "Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(24): 8692-7.
- Vandervelde, S., M. J. van Luyn, et al. (2005). "Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium." J Mol Cell Cardiol **39**(2): 363-76.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease." Circulation **103**(24): 2885-90.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, et al. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res **89**(1): E1-7.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). "The molecular biology of apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2239-44.
- Vaziri, H., W. Dragowska, et al. (1994). "Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 9857-60.
- von Lindern, M., M. Parren-van Amelsvoort, et al. (2000). "Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling." J Biol Chem **275**(44): 34719-27.
- Wall, T. M., R. Sheehy, et al. (1994). "Role of bradykinin in myocardial preconditioning." J Pharmacol Exp Ther **270**(2): 681-9.
- Wang, F. F., C. K. Kung, et al. (1985). "Some chemical properties of human erythropoietin." Endocrinology **116**(6): 2286-92.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **270**(3): 1230-7.
- Wang, X. Q. and N. D. Vaziri (1999). "Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells." Hypertension **33**(3): 894-9.
- Wayman, N. S., M. C. McDonald, et al. (2003). "Models of coronary artery occlusion and reperfusion for the discovery of novel antiischemic and antiinflammatory drugs for the heart." Methods Mol Biol **225**: 199-208.
- Weidl, E. (2007). Die Transplantation humaner endothelialer und angiogener Zellen verbessert die linksventrikuläre Funktion im Myokardinfarktmodell der Nacktratte.
- Wickrema, A., S. B. Krantz, et al. (1992). "Differentiation and erythropoietin receptor gene expression in human erythroid progenitor cells." Blood **80**(8): 1940-9.
- Wiesner, R. (2000). Lexikon der Veterinärmedizin. Stuttgart.
- Williams, G. T., C. A. Smith, et al. (1990). "Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis." Nature **343**(6253): 76-9.
- Witting, A., P. Muller, et al. (2000). "Phagocytic clearance of apoptotic neurons by Microglia/Brain macrophages in vitro: involvement of lectin-, integrin-, and phosphatidylserine-mediated recognition." J Neurochem **75**(3): 1060-70.

LITERATURVERZEICHNIS

- Wolf, R. F., L. S. Gilmore, et al. (1997). "Erythropoietin potentiates thrombus development in a canine arterio-venous shunt model." Thromb Haemost **77**(5): 1020-4.
- Yamaji, R., T. Okada, et al. (1996). "Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA." Eur J Biochem **239**(2): 494-500.
- Yasuda, Y., S. Masuda, et al. (1998). "Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis." J Biol Chem **273**(39): 25381-7.
- Ye, J., L. Yang, et al. (1997). "A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality." Mol Cell Biochem **176**(1-2): 227-33.
- Yoon, C. H., J. Hur, et al. (2005). "Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases." Circulation **112**(11): 1618-27.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 : Vergleichende Betrachtung der intravenösen vs intramyokardialen Injektion von humanen EPCs am Rattenmodell nach Ligatur der LAD (Bewertung mittels Echokardiographie).....	12
Tabelle 2 : EPO-Rezeptoren und die Wirkung von EPO in verschiedenen Geweben (Chong et al. 2002; Genc et al. 2004; Fliser et al. 2006)	17
Tabelle 3 : <i>Mortalitätsrate</i>	65
Tabelle 4 : <i>intraoperative Komplikationen</i>	66
Tabelle 5 : <i>Linksventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumina in ml 1 und 4 Wochen post OP (SEM: Standardfehler, %= prozentualer Anteil des LVESV am LVEDV)</i>	69
Tabelle 6 : <i>Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 4, 10, 15, 17, 13, 7 und 1 im Zweikammerblick (in %)</i>	71
Tabelle 7 : : <i>Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 2+3, 8+9, 14, 17, 16, 11+12 und 5+6 Im Vierkammerblick (in % Verkürzung der Segemnete nach vier Wochen)</i>	73
Tabelle 8 : : <i>Auswertung der Gefäßdichte mit Hilfe der Aktinfärbung im Hauptversuch</i>	78
Tabelle 9 : <i>prozentualer Anteil der CD68+ Zellen an den Gesamtzellen im Randgebiet des Infarktes bei den 3-Tages-Tieren</i>	79
Tabelle 10 : <i>Mortalitätsrate</i>	82
Tabelle 11 : <i>intraoperative Komplikationen</i>	83
Tabelle 12 : <i>Linksventrikuläre Auswurfsfraktion 4 Wochen post OP in%, mit dem MRT bestimmt</i>	84
Tabelle 13 : <i>Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 4,10,15,17,13,7 und 1 im I/R-Lig-Versuch im Zweikammerblick (in %)</i>	87
Tabelle 14 : : <i>Regionale Wandbewegung der Wandsegmente 5+6, 11+12, 16, 17, 14, 8+9 und 2+3 im I/R-Lig-Versuch Im Vierkammerblick (in %)</i>	89
Tabelle 15 : : <i>Auswertung der Gefäßdichte mit Hilfe der Aktinfärbung</i>	93

9. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 : Vergleichende Betrachtung des Phänotyps von „early“ und „late“ EPCs (mit freundlicher Genehmigung von I.Ott).....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 3 : Struktur des EPO-Rezeptors.....</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 4 : JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 7 : Folgen von I/R bzw.permanenter Ligatur am Hundemodell mit Okklusion der proximalen Koronararterie</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 9 : Narkotisierte, intubierte Ratte prä OP; kontinuierliche Messung der Körpertemperatur und der Sauerstoffsättigung im peripheren Blut</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 14 : Localizerequenzen zur Planung der Schnittführung</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 15 : TFE-Sequenzen zur Funktionsdiagnostik</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 16 : Kennzeichnung der Diastole (blaue Linie) und Systole (türkise Linie) im Vier- (a,b,c) und Zweikammerblick (d,e,f) mit dem Computerprogramm „Munich Heart“</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 17 : 17-Segmentmodell der AHA</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 18 : Zweikammerblick des 17-Segmentmodells</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 19 : Vierkammerblick des 17-Segmentmodells.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 20 : Aktinfärbung nach 4 Wochen.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 21: Messung der Wanddicken und der Infarktgröße.....</i>	<i>61</i>
<i>Abbildung 22 : Darstellung der Infarktgröße in der Masson Trichrom-Färbung.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 23 : Aktinfärbung nach vier Wochen; die Gefäße färben sich rot an; nativ (a und c) und mit farblich gekennzeichneten Gefäßen (b und d).....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 24 : CD68-Färbung bei den 3-Tages-Tieren; Makrophagen färben sich leuchtend rot.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 25 :Darstellung der Infarktgröße in der Masson Trichrom-Färbung bei Tieren mit permanenter Okklusion der LAD (a+b) im Vergleich zu Tieren mit Reperfusion (c+d).....</i>	<i>91</i>

10. Diagrammverzeichnis

<i>Diagramm 1 : Entwicklung des Körpergewichtes in g.....</i>	64
<i>Diagramm 2 : LVEF in % im EPO-Versuch.....</i>	67
<i>Diagramm 3: : Linsventrikuläre eddiastolische und endsystolische Volumina in ml nach einer und vier Wochen.....</i>	68
<i>Diagramm 4 : Regionale Wandbewegung(in %) der Wandsegmente 4, 10, 18, 17, 13, 7 und 1 im Zweikammerblick</i>	70
<i>Diagramm 5 : regionale Wandbewegung in% im Vierkammerblick (*: $p<0,05$)</i>	72
<i>Diagramm 6 : Infarktgröße in % nach drei Tagen und vier Wochen</i>	74
<i>Diagramm 7 : Expansionsindex.....</i>	76
<i>Diagramm 8 : Entwicklung des Körpergewichtes in Gramm im Ischämie/Reperfusion-Ligatur-Versuch (prä OP, eine und vier Wochen post OP).....</i>	82
<i>Diagramm 9 : LVEF in %.....</i>	84
<i>Diagramm 10 : Linsventrikuläre enddiastolische und endsystolische Volumina in ml vier Wochen post OP.....</i>	85
<i>Diagramm 11: Regionale Wandbewegung in ml im Zweikammerblick</i>	86
<i>Diagramm 12: Regionale Wandbewegung in ml im Vierkammerblick</i>	88
<i>Diagramm 13 : relative Infarktgrößenach vier Wochen.....</i>	90
<i>Diagramm 14 : Expansionsindex.....</i>	92

11. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	Mikro
°	Grad
A.	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Atipamezol, Anexate (Flumazenil)
AMI	akuter Myokardinfarkt
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivatorprotein-1
ARNT	Aryl receptor nuclear translocator
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ⁺	Kalzium
CD	cluster of differentiation
CFU	colony-forming-units
DE	delayed enhancement
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E ₂	17β-Östradiol
EBM	Endothelial Basal Medium
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
EPO	Erythropoietin
EPOR	Erythropoietinrezeptor
ERK	extrazelluläre Signalkinasen
EZR	Extrazellulärraum
FADD	Todesdomäne-assoziierte Proteine
FasL	Fas Liganden
FFE	Fast field echo
FOV	Field of View
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-CSF
HCP	hämatopoietische Zellen

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HEP	high-energy Phosphate
HF	Herzfrequenz
HIF-1	hypoxia-inducible-factor-1
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HSC	hämatopoetische Stammzelle
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF-1	insulin growth factor-1
IL	Interleukin
ILGF-1	insulin-like growth factor-1
iNOS	induzierbare Nitridoxidsynthetase
IR	Inversion Recovery
IVC	individual ventilated cages
IZR	Intrazellulärraum
JAK2	Januskinase 2
JNK	c-Jun Aminoendkinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
l	Liter
LAD	Ramus interventricularis paraconaris der LCA
LCA	Arteria. coronaria sinistra
LV	linker Ventrikel
LVEDD	left ventricular enddiastolic diameter
LVEDV	linksventrikuläre enddiastolische Kammervolumen
LVEF	linksventrikuläre Auswurfraction
LVESD	left ventricular endsystolic diameter
LVESV	linksventrikuläre endsystolische Kammervolumen
LVFS	linksventrikuläre Verkürzungsfraktion
MACS Säule	Magnetic Cell Sorting Säule
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MHz	Megahertz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

min	Minute(n)
mm	Millimeter
MMF	Medetomidin/Midazolam/Fentanyl-Narkose
MRT	Magnetresonanztomograph(-ie)
msec	Millisekunde(n)
n	Nano
N	Stickstoff
NF- κ B	nuclear factor- κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NW	Nebenwirkungen
O	Sauerstoff
p.o.	per os
PBS	Phosphatase Buffered Saline
PKC	Proteinkinase C
PMNL	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PS	Membranphospholipide
rhEPO	rekombinantes humanes EPO
RNA	Ribonucleinsäure
RNU	Nacktratten
s.c.	subkutan
SCF	stem cell factor
SOD	Superoxiddismutase
STAT	signal transducers and activators of transcription
TE	Echozeit
TFE	Turbo Field Echo
TI	Inversionszeit
TM-Mode	Time-Motion-Mode
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TR	Repetitionszeit
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
ZNS	Zentrales Nervensystem

12. Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. I. Ott für die nette und hilfreiche Betreuung und für die Korrektur des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl danke ich für die Ermöglichung und die Übernahme der Arbeit an die tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Gänsbacher, Direktor des Institutes für experimentelle Chirurgie der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Arbeitsmöglichkeit bedanken.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. Bothner, A. Keithahn und S. Schachoff für die Hilfe und die stets sehr freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen im MRT und bei der Auswertung der Daten.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. S. Nikkola für die Bereitstellung des Computerprogrammes „Munich Heart“ und Dr. med. M. Makowski für die Hilfe bei der Anwendung des Programms und der Auswertung der Ergebnisse.

Ganz besonders danke ich E. Weidl, T. Holzgrefe, S. Schenk und F. Straub für die persönliche Betreuung und ihre Unterstützung für das Gelingen dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei den MTAs Frau C. Bauer, A. Stobbe und Dr. vet med M. Schürmann für ihre tatkräftige Hilfe bedanken.

Vielen Dank auch an die immer nette und humorvolle Hilfe der OP-Schwestern Frau Pohlheimer und Frau Hertl.

Bei den Tierpflegern möchte ich mich für die fachgerechte Betreuung meiner Tiere bedanken.

DIAGRAMMVERZEICHNIS

Ein herzliches „vergelts Gott“ an Familie Meltl, die mich mit allen ihnen möglichen Mitteln bei dieser Arbeit unterstützt und immer versucht hat, mir die z.T. doch sehr anstrengende Zeit so angenehm wie möglich zu gestalten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner **Familie** bedanken, die immer für mich da war und mir zu jedem Zeitpunkt den Rücken frei gehalten hat und ohne die diese Promotion nicht möglich gewesen wäre!